

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
FÜÜSIKA INSTITUUT

Holger Saare

**SUPERPARAMAGNETILISTE
RAUDOKSIIDSETE NANOOSAKESTE SÜNTEES
JA ISELOOMUSTAMINE**

Bakalaureusetöö

Juhendajad:

Martin Järvekülg, PhD, Füüsika Instituut
Rainis Venta, MSc, Tehnoloogia Instituut

Tartu 2015

SISUKORD

1. Sissejuhatus.....	4
2. Kirjanduse ülevaade	6
2.1. Raudoksiidsete nanoosakeste omadused	6
2.1.1. Magnetilised omadused	7
2.1.2. Suurus ja kuju	9
2.1.3. Mürgisus	10
2.2. Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimeetodid.....	12
2.2.1. Termolüüsi meetod	12
2.2.2. Kaassadestamise meetod	13
2.2.3. Mikroemulsioonmeetod.....	13
2.2.4. Hüdrotermaalne süntees	14
2.2.5. Sool-geel meetod	14
2.2.6. Sonokeemiline meetod	15
2.3. Raudoksiidsete nanoosakeste funktsionaliseerimine.....	17
2.3.1. Orgaanilised katted	17
2.3.2. Anorgaanilised katted	18
2.4. Nanoosakeste karakteriseerimise meetodid.....	20
2.4.1. Skaneeriv elektronmikroskoopia	20
2.4.2. Transmissioonelektronmikroskoopia.....	20
2.4.3. Footonkorrelatsioon-spektroskoopia	20
2.4.4. Infrapunaspektroskoopia	21
2.5. Raudoksiidsete nanoosakeste rakendused	22
2.5.1. Magnetresonantstomograafia.....	22
2.5.2. Magnetiline hüpertermia.....	23
2.5.3. Ravimite suunamine	24
2.5.4. Katalüsaatorid.....	25
2.5.5. Käesolevas töös sünteesitud nanoosakeste planeeritud rakendused.....	26
3. Eksperimentaalne osa	28
3.1. Eksperimentides kasutatud ained ja seadmed.....	28
3.1.1. Eksperimentides kasutatud ained.....	28
3.1.2. Eksperimentides kasutatud seadmed	28
3.2. Raudoksiidsete nanoosakeste süntees.....	31
3.2.1. Termolüüsi meetod	31

3.2.2. Kaassadestamise meetod	31
3.3. Funktsionaliseerimine	33
4. Tulemused ja analüüs	34
4.1. Elektronmikroskoopia	34
4.2. Footonkorrelatsioonspektromeetria	37
4.3. Infrapunasektroskoopia	40
5. Kokkuvõte ja järeldused	42
5.1. Kokkuvõte	42
5.2. Järeldused	43
6. Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles.....	44
7. Tänuavaldused	45
Kasutatud kirjandus	46
Lisad	53

1. Sissejuhatus

Nanoosakeseks loetakse füüsikalist osakest, mille ükski suurusmõõde ei ületa 100 nm ehk tegemist on nulldimensionaalse nanomaterjaliga. Nanoosakesed on suure teadusliku väärtusega, sest nende omadused erinevad vastavate lausmaterjalide omadustest. Erilise tähelepanu all on nanoosakeste magnetilised omadused, kus erinevus lausmaterjalidest avaldub tugevalt ning loob võimalusi uuteks tööstuslikeks ning meditsiinilisteks rakendusteks.

Raudoksiidsed nanoosakesed on laialt levinud osakesed, mida leidub nii kosmoses, atmosfääris, maapinnas kui ka elusorganismides. On leitud, et inimaju sisaldab üle 10^8 magnetilise raudoksiidse nanoosakese grammi koe kohta [1]. Tegu on ühe tähtsama siirdemetall-oksiidiga tänu üha laienevatele kasutusvõimalustele. Näiteks kasutatakse antud osakesi ka Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis kontrastainena.

Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimine erinevate rakenduste tarbeks on olnud viimasel kahel kümnendil põhjalikult uuritav valdkond, sest loodud nanoosakeste morfoloogia, mõõtmed ning keemilised ja magnetilised omadused sõltuvalt tugevalt sünteesiprotsessist. Seega on kriitilise tähtsusega leida soovitud rakendusele sobiv sünteesimeetod, mille abil on võimalik luua vajalike omaduste ning suurusjaotusega nanoosakesi ning mille tulem oleks üheselt reprodutseeritav. Loodud on arvukalt nii keemilisi kui füüsikalisi meetodeid, kuid ühtset eelistatud sünteesimeetodit ei ole veel leitud.

Käesoleva töö eesmärgiks on sünteesida raudoksiidseid nanoosakesi termolüüsi ning kaassadestamise meetodil, funktsionaliseerida loodud osakesed, iseloomustada eksperimentaalselt saadud dispersioonide omadused ja arendada välja vastav meetodika ja oskuste baas edasisteks arendusuuringuteks. Antud töö on algfaasiks interdistsiplinaarsele projekte, mille eesmärgiks on superparamagnetiliste nanoosakeste rakendamine innovatiivsetes biotehnoloogilistes rakendustes. Seega on antud töö suunatud võimalikult laia teoreetiliste taustateadmiste loomisele meetodites, mis võimaldaks järgnevates etappides saavutada teadusliku uudsust eelkõige spetsiifilises biofunktsionaalsuses ning vastavates rakenduslikes aspektides.

Töö koosneb kolmest osast. Esimeses osas antakse kirjanduse põhjalik ülevaade raudoksiidsete nanoosakeste omadustest, levinumatest sünteesi- ning karakteriseerimismeetoditest ning võimalikest rakendustest. Töö teises osas kirjeldatakse läbiviidud osakeste sünteesimise ja funktsionaliseerimise protsesse ning kasutatud iseloomustamise meetodeid. Viimases osas interpreteeritakse saadud tulemusi ning tehakse nende põhjal järeldused.

Käesoleva uurimuse tööhüpoteesiks on, et raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimine termolüüsi meetodil tagab loodud osakeste kitsama suurusjaotuse kui kaassadestamise meetodil sünteesitud nanoosakestel ning on seetõttu sobivam protseduur biotehnoloogisteks rakendusteks osakeste loomisel.

2. Kirjanduse ülevaade

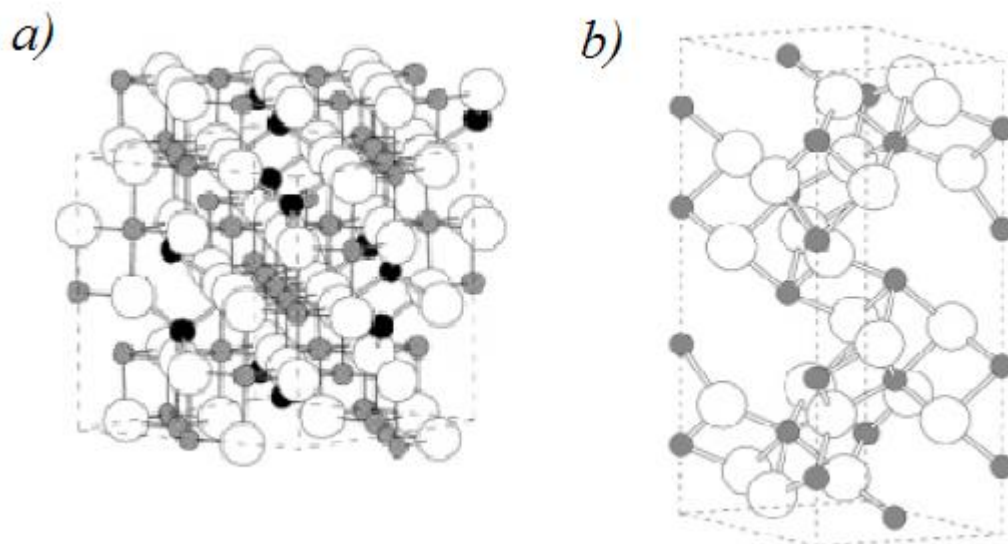
2.1. Raudoksiidsete nanoosakeste omadused

Raudoksiidid on keemilised ühendid, mis koosnevad rauast ja hapnikust. Looduses eksisteerib seitset erinevat vormi raudoksiidseid ühendeid, kuid superparamagnetilisteks nanoosakesteks võib lugeda sünteetilisi maghemiidi $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, magnetiidi Fe_3O_4 ning hematiidi $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoosakesi. Biomeditsiinilistes rakendustes kasutatakse valdavalt maghemiidi ning magnetiidi osakesi tänu kõrgele biosobivusele ning sobivatele magnetilistele omadustele nanoskaalas. Hematiidi nanostruktuurid leiavad rakendust elektrokroomsetes seadmetes ning liitiumpatareides katoodidena [2].

Magnetiit Fe_3O_4 on hallikasmusta värvusega spinelli mineraalrühma kuuluv ferrimagnetiline materjal, mis omab tahktsentreeritud kuubilise võrega kristallstruktuuri. Magnetiit on tuntud ka magnetrauamaagina, sest see on rauamaagis enim esinev ühend ning esimene avastatud magnetiline materjal. Magnetiit kaotab enda algsed magnetilised omadused ning muutub paramagnetiks temperatuuril üle 860 K [3]. Hapniku reageerides moodustab magnetiit hematiidi. Magnetiidi ning hematiidi kristallstruktuurid on kujutatud joonisel 1.

Maghemiit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ on pruunika värvusega metastabiilne faas magnetiidi ning hematiidi vahel, kuna tal on sarnane kristallstruktuur magnetiidiga ning sama keemiline koostis hematiidiga. Maghemiit erineb magnetiidist selle poolest, et tema võrestruktuuris esineb ainult trivalentseid rauaioone ning seetõttu on võres puuduvatest katioonidest tekkinud augud. Maghemiit omab Curie temperatuuri 890 K ehk antud väärtus on mõnevõrra suurem kui magnetiidil [3]. Piisava aja möödudes omandab maghemiit hematiidiga sarnase kristallstruktuuri ka toatemperatuuril.

Hematiit $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ on üks põhilisi rauamaagis sisalduvaid aineid ning teda tuntakse tumepunase värvipigmendina. Hematiit omab heksagonaalset romboeedrilist süngooniat ning erinevalt magnetiidist ning maghemiidist on ta tavatingimustes antiferromagneetiline. Temperatuuridel üle 920 K muutub hematiit magnetiidiks [4]. Tavatingimustes on antud vorm raudoksiididest termodünaamiliselt kõige stabiilsem, kuid on näidatud, et mõõtmete vähenedes magnetiidi ning maghemiidi nanokristallide stabiilsus kasvab [5]. Nimetatud omadust põhjendatakse hematiidi kõrgema pinnaenergiaga. Hematiidi Néeli temperatuur on 948 K [3].



Joonis 1. Magnetiidi kristallstruktuur (a) ning hematiidi kristallstruktuur (b). Tumedana on märgitud raua ioonid ning heledana hapniku ioonid, punktiir tähistab ühikrakku [4].

2.1.1. Magnetilised omadused

Väikesest läbimõõdust tingitud suure eripinna tõttu esineb nanoosakestel märgatavalt teistsuguseid magnetilisi omadusi kui sama aine lausmaterjalil. Nimetatud magnetilisi omadusi kirjeldavateks põhisuurusteks on

- Curie temperatuur T_C – väärtus, millest kõrgemal temperatuuril muutub ferromagnetiline materjal paramagnetiliseks;
- küllastusmagneetumus M_s – näitab maksimaalset magnetvälja tugevust, mida antud materjal suudab tekitada;
- vahetusjäikus A (ingl. k *exchange stiffness*) – iseloomustab magnetiliste momentide vahetusmõju tugevust magnetis;
- koertsiivus H – magnetvälja tugevus, mis materjalile rakendudes muudab selle jääkmagneetumuse nulliks;
- anisotroopia konstant K – iseloomustab magnetilise materjali omadust magneetida teatud suundades lihtsamini kui ülejäänutes.

Üldiselt sõltub nanokristallide magnetiline iseloom materjali enda ning ümbritseva keskkonna füüsikalistest omadustest. Tähtsamad sellised parameetrid on näiteks osakeste keemiline koostis, suurus ja kuju ning keskkonna temperatuur ja välise magnetvälja olemasolu.

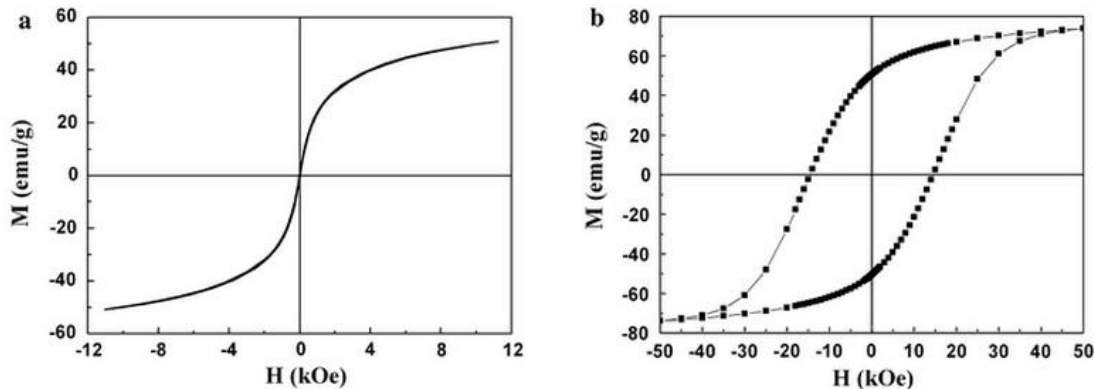
Magnetilised materjalid jaotuvad domeenideks, mille piires on osakeste spinn-omamagnetväljal ühtne kindel suund. Magnetdomeenide jaotus ning omavaheline suund põhjustavad magnetiliste materjalide vaheliste omaduste erinevused. Nimetatud domeenid on eraldatud

domeeniseintega, mis on lõpliku suurusega ruumi osad, kus toimub magnetvälja suuna ühtlane pöördumine. Nanoosakese piisavalt väikeste mõõtmete korral muutub osake ühedomeeniliseks, sest domeeniseinte loomine ei ole enam energeetiliselt eelistatud. Selline omadus on osakestel, mille suurus on allpool kriitilist raadiust R_c . Sfääriliste nanoosakeste korral on antud raadius arvutatav valemiga 1 [6].

$$R_c = 36\sqrt{AK}/\mu_0 M_S^2, \quad (1)$$

kus μ_0 on magnetiline konstant. Antud kriitilise raadiuse väärtused jäävad tüüpiliselt vahemikku ~10 nm kuni 100 nm. Magnetiidi nanoosakese jaoks on selleks suuruseks mõõdetud 49 nm ning maghemiidil 30 nm, kuid antud väärtused on ligikaudsed ning varieeruvad sõltuvalt osakeste omadustest [7].

Magnetilise anisotroopia tõttu püsib osakese magnetmoment stabiilsena kahes vastassuunalistel kergmagneetumistelgedel asuvatel olekutes. Need kaks telge on omavahel eraldatud energeetilise barjääriga ning üleminek olekute vahel on tõenäosuslik protsess. Energia, mis kulub magneetumise suuna pöördumiseks ühest stabiilsest konfiguratsioonist teisele on võrdeline suurusega $KV/k_B T$, kus V on osakese ruumala, k_B on Boltzmanni konstant, T on temperatuur ning korrutis KV annab anisotroopia energia väärtuse [8]. Kui soojuslik energia $k_B T$ on väiksem kui anisotroopia energia, siis käitub süsteem nagu ferromagnet. Vastupidisel juhul ei ole magneetumus enam stabiilses olekus ehk välise magnetvälja rakendamisel osakesed magneetuvad küllastusmagneetumuse väärtuseni ning välja eemaldamise korral ei ilmuta nad enam magnetilisi tunnuseid [6]. Seega ilma välise magnetväljata ei esine ka hüstereseesi nähtust, ehk osakeste keskmine magneetumus on null (vt. joonis 2). Sellist magnetismi vormi nimetatakse superparamagnetismiks. Antud nähtus on omadustelt sarnane paramagnetismile, kuid erinevuseks on superparamagnetite märgatavalt suurem magnetiline vastuvõtlikkus [9].



Joonis 2. Superparamagnetilise materjali hüsteresisilmuse (a) ning ühedomeenilise ferromagneetilise nanoosakese hüsteresisilmuse (b) võrdlus [10].

Superparamagnetilise osakese magneetumuse suund kõigub kahe kergmagneetumisteljel asuvate stabiilsete olekute vahel perioodiga, mille keskmist väärtust nimetatakse Néeli relaksatsiooni ajaks. See on arvutatav Néeli-Browni võrrandiga

$$\tau = \tau_0 \exp(KV/k_b T), \quad (2)$$

kus τ_0 on materjalile omane ajalise dimensiooniga konstant, mis on üldiselt suurusjärgude vahemikus 10^{-12} kuni 10^{-9} s [11]. Eksisteerib blokeeriv temperatuur T_b , mille väärtusest madalamatel temperatuuridel paistab osakese magnetmoment paigal olevat (vt. võrrand 3) [11]. See tähendab, et antud temperatuuri väärtustel erineb keskmine magneetumine nullist ning osake ei ole enam superparamagnetik. Antud nähtus esineb eksperimentaalsetel mõõtmisaegadel τ_M , mis on palju väiksemad Néeli relaksatsiooni ajast.

$$T_b = KV/k_B \ln(\tau_M/\tau_0) \quad (3)$$

Võrrandist on näha, et kui osakesed ei ole monodisperssed, siis põhjustab nende suurusjaotus ka blokeerivate temperatuuride jaotuse. Antud omadus on tähtis rakendustes, kus on vajalik tagada superparamagnetiliste nanoosakeste omaduste ühtsus.

Nanoosakeste magnetilised omadused sõltuvad tugevalt ka kasutatud sünteesimeetodist [12]. Meisen *et al.* suutsid kaassadestamise sünteesimeetodi parameetreid varieerides luua magnetilisi raudoksiidseid nanoosakesi, mille koertsiiivsused jäid vahemikku 2.4 kA/m kuni 20 kA/m [13].

2.1.2. Suurus ja kuju

Magnetilise nanoosakese tähtsaimad omadused on suurus ning kuju, sest nendest parameetritest sõltuvad ka tema magnetilised omadused, pinnaefektid ning rakendatavuse võimalused. Reaalselt ei ole nanoosakeste ansambel ideaalselt monodisperssne, vaid koosneb teatud jaotust järgivatest osakeste suurustest. Eksperimentaalselt on näidatud, et nanoosakeste kogumi suurusjaotus disperssetes süsteemides järgib normaaljaotust või logaritmilist normaaljaotust [14]. Logaritmilises jaotuses allub normaaljaotusele osakeste diameetrite logaritm. Antud jaotus on funktsioon osakese diameetrist d ning jaotust iseloomustavad parameetrid on osakese mediaansuurus d_0 ning standardhälve σ . Logaritmiline normaaljaotus on esitatud valemi kujul võrrandis 4.

$$f(d) = \frac{1}{d\sqrt{2\pi} \ln(\sigma)} \exp\left(-(\ln d/d_0)^2 / 2(\ln \sigma)^2\right) \quad (4)$$

Kirjanduse põhjal peab superparamagnetiliste omaduste ilmutamiseks maghemiit-nanoosake üldjuhul olema suurusega alla 15 nm [15]. Osakeste minimaalsele suurusele seab piirangud konkreetne rakendusmeetod. Biomeditsiiniliseks kasutamiseks ei sobi nanoosakesed suurusega alla 2 nm, sest nii väikesed osakesed suudavad difundeeruda läbi rakumembraani ning kahjustada rakusiseseid organelle [16].

Pinnaefektid on tingitud tsentraalsümmeetria puudumisest osakese välimises kihis ning vähenenud koordinaatsiooni arvust [17]. Osakese suuruse vähenemine põhjustab pinnal asetsevate spinnide ning spinnide koguarvu suhte suurenemist. Näiteks 8 nm diameetriga maghemiidi osakesel asub 50 % tema aatomitest pinnal, 6 nm diameetri korral on antud väärtuseks juba 80 % ning 4 nm diameetriga nanoosakesel moodustavad pinnakihi kõik tema aatomid [18]. Seega võib väita, et nanoosakese suuruse vähenemine põhjustab pinnakihi moodustavate aatomite kaudu osakese reaktiivsuse suurenemise.

Sarnaselt eelnevalt kirjutatule mõjutab ka nanoosakese kuju tema omadusi eripinna ning aatomite paigutuse kaudu. Tasased pinnad on vähem reaktiivsemad kui sfäärilased pinnad ning samuti on võimalik sünteesida õõnsaid nanoosakesi, millel asuvad kõik aatomid pinnakihis ka suuremate diameetrite korral. Mahmoudi *et al.* näitasid, et tilga, ussi ning sfäärilise kujuga paramagnetilised raudoksiidsed nanoosakesed omavad suuremat biotoksilisust kui nanovardad ning kolloidsed nanokristalli klastrid [19].

Nanoosakeste suurust on võimalik mõõta mitmete erinevate meetoditega, näiteks elektronmikroskoopiaga, footonkorrelatsioonispektromeetriaga, neutron ning röntgendifraktsiooni analüüsiga, röntgen-neeldumisspektroskoopiaga jne. Osakeste kuju on võimalik uurida visuaalsete meetoditega, eelkõige elektronmikroskoopiaga.

2.1.3. Mürgisus

Raudoksiidsete nanoosakeste peamiseks rakendusvaldkonnaks on biomeditsiin, eelkõige kasutatakse neid magnetilises hüpertermias (vt. alajaotis 2.4.2). Antud töö on osa arendustööst, kus nanoosakeste lõpprakendus on samuti bioloogilistes süsteemides, seega on osakeste bioloogiline mõju ja võimalik mürgisus materjali juures olulise tähtsusega aspekt. Nanoosakeste võimalike kahjulike mõjude uurimisega tegeleb nanotoksikoloogia teadusharu. Materjali toksilisuse välja selgitamine on kriitilise tähtsusega biomeditsiinilistes rakendustes, kus nanoosake võib põhjustada inimese surma või tekitada jäädavaid kahjustusi. On läbi viidud mitmeid uuringuid, et välja selgitada superparamagnetiliste osakeste biosobivust ning nende interaktsiooni erinevate rakkudega [16]. Tulemused on näidanud, et raudoksiidsete nanoosakeste

mürgisus ning jaotumine organismis sõltub tugevalt nende suurusest, pinnakattest ja –laengust [19]. Näiteks dekstraaniga kaetud ning ka ilma katteta magnetiit-nanoosakesed põhjustasid rakkude jagunemise aeglustumise ja rakusurma juba 50 µg/ml kontsentratsiooni juures, kuid albumiin-kattega osakestel ei täheldatud mingit tsütotoksilisust [20]. Lisaks on kriitilise tähtsusega osakeste stabiilsus, sest aglomeratsiooni tõttu võivad osakesed sadestuda ning põhjustada veresoonte ummistumist.

Karlsson *et al.* võrdlesid erinevate metalloksiididest nanoosakeste mürgilisust *in vitro* ning avastasid, et raudoksiidsed nanoosakesed on turvalised ja mittetsütotoksilised kontsentratsioonis, mille väärtus jääb alla 100 µg/ml [21]. Ankamwar *et al.* viisid läbi uuringu, milles vaatlesid bipolaarse kattega nanoosakeste mürgisust harilikes, rinnavähi- ning gliiarakkudes [22]. Osakesed ei ilmutanud mingeid mürgisuse tunnuseid kontsentratsioonide vahemikus 0.1 - 10 µg/ml, kuid tsütotoksilisust täheldati kontsentratsioonidel üle 100 µg/ml. Lisaks nimetatud tulemustele on avaldatud veel mitmeid uuringuid, mis on näidanud raudoksiidsete nanoosakeste ohutust madalatel kontsentratsioonidel [23] [24].

Teisalt võib raua kuhjumine kindlas kehapiirkonnas põhjustada võimetust säilitada homöostaasi, mille potentsiaalseteks tagajärgedeks on DNA kahjustumine, põletiku teke, oksüdatiivne stress ning rakusurm. Samuti võib ensüüm lüsosüüm vabastada nanoosakestest Fe²⁺ ioone. Antud raua ioon võib reageerida mitokondris oleva vesinikperoksiidiga või hapnikuga ning selle tagajärjel moodustada genotoksilise ning suure reaktsioonivõimega vaba radikaali. [25]

Hoolimata võimalikest negatiivsetest kõrvalmõjudest on superparamagnetilised raudoksiidsed nanoosakesed ainsad magnetilised nanoosakesed, mis on saanud heakskiidu kliiniliseks kasutamiseks. [26]

2.2. Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimeetodid

Magnetiliste nanoosakeste rakenduslike võimaluste tõttu on kasvanud nende süntees laialt uuritavaks valdkonnaks. Loodud on nii füüsikalisi sünteesimeetodeid, näiteks mehaaniline jahvatamine ja vaakumsadestamine, kui ka keemilisi sünteesimeetodeid, millest levinumad on kaassadestamise meetod, sool-geel süntees, termolüüsi meetod, mikroemulsioonmeetod ning hüdrotermaalne sünteesimeetod. Valdavalt eelistatakse raudoksiidsete nanoosakeste loomisel keemilisi sünteesimeetodeid tänu suuremale parameetrite (osakeste suurus, kuju, kristallilisus jms.) kontrollimise võimalusele. Järgnevalt on välja toodud mõningad enim kasutuses olevad sünteesimeetodid, nende eelised ning puudused. [27]

Kirjeldatud sünteesimeetodite omadusi kokkuvõttev tabel on toodud käesoleva peatüki lõpus (tabel 1).

2.2.1. Termolüüsi meetod

Raudoksiidsete nanomaterjalide valmistamine termolüüsi meetodil on üks käesoleva töö eksperimentaalses osas kasutatud sünteesimeetodeid. See võimaldab luua monodispersse suurusjaotusega ning kõrge kristallilisusega osakesi suures mahus [28]. Antus töös valiti sünteesimise läbiviimiseks just see meetod, sest nimetatud omaduste tõttu on see meetod eelistatud viis sünteesimaks osakesi biomeditsiinilisteks rakendusteks [29].

Nanoosakeste loomine termolüüsi meetodil põhineb stabiliseeriva pindisega segatud metallorgaaniliste ühendite termilisel lagunemisel orgaanilises solvendis. Kasutatakse kõrge keemistemperatuuriga solvente, millest levinumad on oktatetseen, dokosaan ning fenüül- ja oktüüleeter [30]. Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesil kasutatakse metallorgaaniliste ühenditena raua karboksülaatsoolasid. Loodud nanoosakeste suurus, kuju ning kristallilisus sõltuvad reaktsiooni temperatuurist, kasutatud lähteainetest ning nende kontsentratsioonist [28].

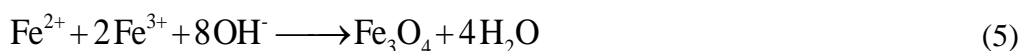
Esimesena tutvustas antud meetodit Alivisatos *et al.*, näidates, et kitsa suurusjaotusega maghemiit-nanoosakesi on võimalik sünteesida raud(III)kupferroon kompleksi (N-nitrosofenüülhüdrosüülamiini Fe^{3+} komplekssool) termolüüsiga trioktüülamiinis [31].

Põhinedes raua karboksülaatide termolüüsile, sünteesisid Yu *et al.* magnetiit-nanokristalle. Selleks kuumutati $\text{FeO}(\text{OH})$ pulbri, oleiinhappe ning 1-oktatetseeni segu 320 °C juures kuni lahuse värvus muutus mustaks. Saadud raudoksiid-nanoosakeste läbimõõt jäi vahemikku 6-30 nm ning olid kitsa suurusjaotusega ($\sigma = 5\text{-}10\%$). [30]

2.2.2. Kaassadestamise meetod

Kaassadestamise meetod on teine käesoleva töö eksperimentaalses osas rakendatud sünteesimise viis. Tegu on enim publitseeritud superparamagnetiliste raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimise meetodiga, mis põhineb rauasoolade hüdrolüüsil [32]. Esimesena tutvustasid antud sünteesi käiku Welo ja Baudisch 1925. aastal [33]. Magnetiidi valmistamiseks viiakse 2:1 molaarsuhtega Fe^{3+} ning Fe^{2+} ioonid inerts keskkonnas olemas tugevalt aluselisse lahusesse. Antud molaarsuhte säilitamine katse vältel on vajalik, et vältida mittemagnetiliste rauaühendite (näiteks götiidi) teket. Hapniku eemaldamine sünteesikeskkonnast on tarvilik Fe^{2+} iooni ning Fe_3O_4 oksüdatsiooni vältimiseks. Lisaks vähendab inertse keskkonna loomine saadud osakeste suurust võrreldes hapnikuga keskkonnas läbiviidud sünteesiga [34].

Magnetiit-nanoosakeste sünteesi reaktsioon on esitatav võrrandiga (5).



Saadud raudoksiidsete nanoosakeste kuju ning suurus sõltub kasutatava soola tüübist, reaktsiooni temperatuurist, lahuse ioontugevusest ja pH väärtusest ning $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ionide suhtest [35].

Kaassadestamise meetodi suurimaks puuduseks on loodud osakeste lai suurusjaotus, mis põhjustab osakeste laia blokeeriva temperatuuri jaotuse, mistõttu ei ole antud osakesed kasutatavad mitmetes rakendustes. Ometigi valiti käesolevatöö eksperimentaalses osas kasutatavaks sünteesimeetodiks just antud meetod, sest tegu on lihtsa ning odava protsessiga, mis võimaldab toota nanoosakesi ka suures mahus.

2.2.3. Mikroemulsioonmeetod

Mikroemulsioon on termodünaamiliselt stabiilne dispersioon kahest mittesegunevast ainest (enamasti vesi ja õli) ning pindaktiivsest ainest [36]. Nendes on pindise monokihiga ümbritsetud veefaas disperseeritud mikrotilkadena pidevasse õlifaasi. Antud konfiguratsioonis on pindise hüdrofoobsed sabad lahustunud õli faasis ning hüdrofiilsed pead veefaasis.

Segades kokku kaks soovitud reagenti sisaldavat mikroemulsiooni, nendes olevad mikrotilkad pidevalt põrkuvad, liituvad ning katkevad taas [27]. Selline protsess tingib ainete sadestumise, mis võimaldab antud meetodiga nanoosakesi sünteesida. Tekkinud osakesi on võimalik ekstraheerida lisades mikroemulsioonile solventi, näiteks atsetooni või etanooli, ja seejärel segu

filtrerides või tsentrifuugides. Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesiks segatakse kokku Fe^{2+} ja Fe^{3+} ioone sisaldav mikroemulsioon OH^- rühma sisaldava mikroemulsiooniga [37].

Antud meetodi eelduseks on nanoreaktoritena käituvad mikrotilgad, mis suletud ruumina piiravad nanoosakeste kasvu ning takistavad aglomeratsiooni sünteesil. Muutes vee, õli ning pindise molaarsuhet on võimalik mikrotilkade mõõtmeid muuta ning seega ka kontrollida osakeste suurusjaotust [36].

Mikroemulsioonmeetodi puudusteks on väike saagikus, suure solvendikoguse vajalikkus ning piiratud reaktsioonimaht.

2.2.4. Hüdrotermaalne süntees

Raudoksiidsete nanoosakeste hüdrotermaalne süntees viiakse läbi kõrgel rõhul (üle 2000 psi) olevas autoklaavis, kus on võimalik tõsta solventide temperatuuri üle nende keemispunktide. Selliseid reaktsioone nimetatakse hüdrotermaalseteks vaid juhul, kui solvendiks on vesi. Loodud tingimustes on metallisoolade lahustuvus ning reaktiivsus suuremad kui normaaltingimustes, mis tagab kõrge kristallilisusega nanoosakeste tekke [38]. Antud meetodiga sünteesitavate nanoosakeste kuju on võimalik kontrollida reaktsiooni temperatuuri, rõhu ning sünteesiprotsessi kestvuse kaudu [39].

Hüdrotermaalset sünteesi on võimalik läbi viia nii pindaktiivset ainet kasutades, kui ka ilma pindiseta. Näiteks, Wang *et al.* avalikustasid ühesammulise hüdrotermaalse sünteesiprotsessi ilma pindist kasutamata [40]. Reaktsioon viidi läbi 140 °C juures ning kestis 6 tundi. Tulemuseks saadi keskmiselt 40 nm läbimõõduga osakestest koosnev Fe_3O_4 nanopulber. Seevastu Zheng *et al.* sünteesisid hüdrotermaalse meetodiga 27 nm suurusel magnetiit-nanoosakesed, kasutades pindaktiivse aine dioktüülnaatriumsulfosuksinaati [41].

2.2.5. Sool-geel meetod

Sool-geel protsess baseerub anorgaanilistel polümerisatsioonireaktsioonidel ning koosneb neljast etapist: hüdrolüüsist, polükondensatsioonist, kuivatamisest ning termaalsest lagundamisest. Molekulaarsete lähteainete (valdavalt metallide alkoksiidide) hüdrolüüsi ning kondenseerumisega luuakse nanoosakestest sool. Sool on solvendis paiknevate kolloidosakeste tasakaaluline dispersioon. Sooli edasisel kondenseerumisel on võimalik tekitada geel, mis sisaldab metalloksiidide ahelatest koosnevat võrgustikku ning meetodi nimi viitab just sellele üleminekule, kuid nanoosakeste puhul klassikalises mõttes geeli ei tekitata. Kuna algne

reaktsioon viiakse läbi toatemperatuuril on kristalliseerumiseks tarvilik kuivatud süsteemi kuumutada. Lisaks aitab materjali termiline töötlus eemaldada orgaaniliste ainete ja lahustite jääke. Del Monte *et al.* näitasid, et kuumutades loodud geeli temperatuuril 400 °C on võimalik sünteesida γ -Fe₂O₃ nanoosakesi suurusvahemikus 6 – 15 nm [42].

Sünteesitud nanoosakeste suuruse ning kuju määravad lähteainete kontsentratsioonidest, kasutatud solvent, temperatuur ning lahuse pH-tase [43] [44]. Antud meetodi eelisteks on madal reaktsioonitemperatuur, lihtne sünteesimise protseduur ning lõppsaaduse homogeensus.

2.2.6. Sonokeemiline meetod

Sonokeemia on uurimisvaldkond, milles suure võimsusega ultrahelikiirgus põhjustab molekulides keemilisi reaktsioone. Antud nähtuse põhjustab vedelikus paiknevate mullide akustiline kavitatsioon. Mulli lõhknemisel tekib lokaliseeritud kuum punkt rõhuga ligikaudu 1800 atm ning temperatuuriga alates 5000 K, mis jahtub kiirusega 10⁹ K/s [45].

Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimiseks sonokeemilisel meetodil lastakse fikseeritud sagedusega helilaineid läbi vastavaid orgaanometallilisi lähteaineid sisaldavast lahuse. Saadakse poorne amorfne materjal, mis koosneb aglomereerunud osakekestest [45]. Kristallilise materjali saamiseks on tarvis antud pulbrit lõõmutada.

Vijayakumar *et al.* sünteesisid sonokeemilise meetodiga Fe₃O₄ pulbri, mille osakeste suurus oli ligikaudu 10 nm [46]. Selleks nad sonikeerisid 20 kHz sagedusega vesilahuses olevat raud(II)atsetaati, mis paiknes inerts keskkonnas.

Sonokeemiline sünteesimismeetod võimaldab luua monodispersseid raudoksiid nanoosakesi, mille mõõtmed on lihtsasti kontrollitavad, kuid antud protsessi saagikus on väike.

Tabel 1. Raudoksiidsete nanoosakeste sünteesimeetodite võrdlus.

Meetod	Reaktsiooni temperatuur (°C)	Osakeste suurusvahemik (nm)	Eelised	Puudused	Viited
Termolüüs	100-320	3-20	Võimalik sünteesida suures mahus, kitsas suurusjaotus, suur kristallilisus, osakeste suurus kontrollitav	Saadud osakesed lahustuvad enamasti vaid mittepolaarsetes solventides.	28,30, 31
Kaassadestamine	20-90	10-200	Võimalik sünteesida suures mahus, odav, lihtne metoodika	Lai suurusjaotus, madal kristallilisus, osakeste suurus raskesti kontrollitav	35,47, 81
Mikroemulsioon	20-50	4-15	Kitsas suurusjaotus, lihtne metoodika	Madal saagikus, pindist keeruline eemaldada, väike reaktsiioonimaht, kallis	36,82
Hüdrotermaalne süntees	130-250	4-40	Kitsas suurusjaotus, suur kristallilisus, võimalik luua soovitud suuruse ja kujuga osakesi	Keeruline sünteesiprotsess, mis on raskesti reprodutseeritav	40, 41
Sool-geel meetod	200-400	20-200	Võimalik sünteesida soovitud kujuga osakesed, sobib magnetiliste pulbrite valmistamiseks	Lai suurusjaotus, kallis, keeruline metoodika	42,43, 44
Sonokeemiline	20-25	10-30	Kitsas suurusjaotus, võimalik sünteesida soovitud kujuga nanoosakesi, lihtne metoodika	Osakeste suurus raskesti kontrollitav, väike reaktsiioonimaht	45,46

2.3. Raudoksiidsete nanoosakeste funktsionaliseerimine

Raudoksiidsete nanoosakeste suurusest tulenevad erilised magnetomadused on loonud laialdasi kasutusvõimalusi nii tööstuslikes kui ka meditsiinilistes rakendustes. Ferrovedelikuna on antud osakesi kasutatud erinevate seadmete võnkumiste summutamiseks ja nende jahutamiseks, vedela laagrina ning pöördvõlli tihendina [48]. Uuimateks tööstuslikeks rakendusteks on mikrokõlarite ehitamine, mille diafragma suurus on alla 50 mm; väiksemate ning kvaliteetsemate kuulmisabide tootmine; arvuti kõvaketta tihendamine ning ka DWDM optiliste filtrite loomine, mida kasutatakse andmeedastuses suurte kiiruste võimaldamiseks [49].

Raudoksiidseid nanoosakesi uuritakse tänu nende paljulubavatele rakendustele ka biomeditsiiniliseks kasutamiseks. Suuresti just superparamagnetiliste raudoksiidsete nanoosakeste nähtav potentsiaal on tinginud uue kiiresti areneva nanomeditsiini valdkonna tekke. Meditsiinilistes rakendustes on tähtis tagada osakeste biosobivus ning monodisperssus, et osakesed oleksid ühtlaste omadustega. Kasutatavad nanoosakesed funktsionaliseeritakse ehk nende pind kaetakse kihiga, mille külge on võimalik kvantitatiivselt siduda rakendusteks vajalikke biomolekule. Pinnakatte lisamine põhjustab raudoksiidsetes nanoosakestes mitmeid muutuseid, mis on tarvilikud nende biomeditsiinilisteks rakendusteks:

- suurendab osakeste stabiilsust, vähendades aglomeerumist, mis on tingitud hüdrofoobsest pinnast ning suurest eripinnast;
- parandab osakeste keemilist stabiilsust;
- võimaldab kaetud osakese ning ravimimolekuli või ligandi konjugeerumist;
- vähendab nende toksilisust ning suurendab bioühilduvust [50].

Pinna katmiseks kasutatakse orgaanilisi molekule, näiteks pindiseid või polümeere, ning mitmeid anorgaanilisi materjale, näiteks ränidioksiidi, metalle, metallioksiide või –sulfiide.

2.3.1. Orgaanilised katted

Orgaanilisi katendeid kasutatakse valdavalt raudoksiidsete nanoosakeste sünteesi vältel või vahetult pärast seda, et takistada nende aglomeerumist. Pindised ja polümeerid jäävad magnetilise nanoosakese pinnale ühe- või kahekordse kihina, mis loob eelkõige steriilise tõukejõu, et tasakaalustada osakeste vahelised van der Waalsi ja magnetilised tõmbejõud [51].

Kasutades katmiseks pindiseid või polümeere säilivad nanoosakeste magnetilised omadused ning ka kattematerjali enda algsed omadused. Lisaks varustab orgaaniline katend osakest funktsionaalrühmaga, mille külge on edasisteks rakendusteks võimalik siduda soovitud bioloogilist ainet, näiteks antikehi, proteiine, DNA-d või ensüüme [51].

Enim kasutatakse magnetiitosakeste katmiseks polümeere, mis sisaldavad karboksüülhappe, fosfaatide või sulfaatide funktsionaalrühmasid [4]. Sellised polümeerid on näiteks polüpürrool, polüaniliin, polüalküülsüanoakrülaat, polüpiimhape, polüglükoolhape ning neile vastavad kopolümeerid.

Orgaaniliste katetega nanoosakeste puudusteks on nende leostumine happelistes lahustes, mis põhjustab nende magneetumuse nõrgenemise, ning vähene stabiilsus kõrgetel temperatuuridel ja hapniku käes [52].

2.3.2. Anorgaanilised katted

Osakeste funktsionaliseerimiseks kasutatakse anorgaanilistest materjalidest erinevaid metalle, metallioksiide või –sulfiide. Raudoksiidseid nanoosakesi kaetakse enim ränidioksiidi ning kullaga.

Ränidioksiidist kate on kõrge hüdrofiilsuse ja bioühilduvusega ning stabiliseerib magnetilisi nanoosakesi kahel moel. See peatab osakeste vahel mõjuva magnetilise dipool-vastasmõju ning negatiivse laengu tõttu võimendab see nanoosakeste vahelist elektrilist tõukejõudu [53]. Erinevalt orgaanilistest pinnakatetest hoiab ränidioksiidi kasutamine kolloidosakesi stabiilsena erinevate pH-väärtuste ning elektrolüütide kontsentratsioonide juures [54]. Ränidioksiid-katte suur eelis on pinnale jääva silanoolrühma olemasolu, mis võimaldab lihtsalt siduda endaga alkoholi või silaani sidestusreagente, mille külge saab kovalentselt siduda bioaktiivseid molekule.

Näiteks ühendasid Lu *et al.* silaankattega raudoksiid nanoosakeste külge kaks erinevat fluorestsents-värvainet, kasutades sidestusreagendina 3-aminopropüültrietoksüsilaani. Värvainete otsene ühendamine rauast tuuma külge põhjustab luminesentsi nõrgenemise. [55]

Üks näide üldkasutuses olevast ränidioksiidkattega raudoksiid nanoosakesest on kontrastaine GastroMark (ferumoxsil). Antud tootes on kaassadestamise meetodiga loodud 10 nm diameetriga raudoksiidsed nanoosakesed kaetud inertse räniühendiga [3-(2-amino-

etüülamino)propüül]trimetoksülaad. Loodud segu tarbitakse 600 mL kaupa (sisaldab 105 mg rauda), et parandada soolestikust magnetresonantstomograafiaga tehtud pildi kontrastsust. [56]

Raudoksiidsete nanoosakeste katmine kullaga parandab nende funktsionaalsust ning takistab osakese oksüdatsiooni, kuid saavutatav kattekihi paksus ei ole piisavalt suur, et takistada kolloidosakeste agregeerimist. Selleks seotakse sünteesimise käigus osakese pinnale iooniline ligand, mille elektriline laeng põhjustab nanoosakeste tõukumist.

Kuldkattega nanoosakesed on kõrge rakendusliku väärtusega, sest nad on madala reaktiivsusega ning nende pinda saab siduda tiolrühmadega, mis võimaldavad luua materjale, mida saab kasutada katalüütilistes ning optilistes rakendustes [57].

2.4. Nanoosakeste karakteriseerimise meetodid

2.4.1. Skaneeriv elektronmikroskoopia

Skaneeriva elektronmikroskoobi (SEM) tööpõhimõte baseerub kiirendatud elektronkimbu suunamisel uuritavale objektile. Antud kiir liigutatakse rida-realt üle proovi, et saada kujutis terve objekti kohta. Elektronide ja aine vastasmõju tulemusena peegelduvad materjalist kõrge energiaga elektronid ning lüüakse välja ka madala energiaga sekundaarelektrone. Nende arvu ja energiat analüüsides on võimalik saada informatsiooni uuritava proovi topoloogia ning keemilise koostise kohta. SEM-i eelisteks on objekti kerge prepareerimine, suur sügavusteravus ning lahutusvõime, mis võimaldab uurida nanosuuruses objekte. Halva elektrijuhtivusega materjalide puhul on enamasti vajalik proovi katmine juhtiva kihiga, et hoida ära pinna laadumisest tulenevaid signaalide moonutusi.

2.4.2. Transmissioonelektronmikroskoopia

Transmissioonelektronmikroskoop (TEM) on üks enim nanoosakeste karakteriseerimiseks kasutatud seadmeid. Sarnaselt SEM-iga kasutab TEM proovist kujutise loomiseks kiirendatud elektronide voogu, mis tekitatakse elektronkahuriga. Informatsiooni objekti kohta saadakse materjali läbivatest elektronidest, mis fokuseeritakse vastavale sensorile. Seega on tarvilik, et uuritav proov oleks elektronide läbimise võimaldamiseks piisavalt õhuke. TEM-i eeliseks SEM-i ees on suurusjärgu võrra kõrgem maksimaalne lahutusvõime (ligikaudu 0.2 nm) ning võimalus saada informatsiooni materjali sisemise struktuuri kohta. Võrreldes SEM-iga on antud meetodil kõrgem hind ning proovide ettevalmistamise protsess ja mõõtmise teostamine keerukam.

2.4.3. Footonkorrelatsioon-spektroskoopia

Footonkorrelatsioon-spektroskoopia on dünaamilisel valguse hajumisel (ingl. k *dynamic light scattering* ehk *DLS*) põhinev meetod, mille abil on võimalik määrata osakeste suurusjaotust. Antud meetodiga uuritakse molekule ja osakesi, mis on disperseerunud või lahustunud vedelikus. Suspensioonis paiknevate osakeste Browni liikumine põhjustab pealelangeva kiirguse hajumist erinevatel intensiivsustel. Kasutades Stokes-Einsteini seost (võrrand 6) on võimalik mõõdetud kiirguse intensiivsuse põhjal arvutada osakeste diameetrite väärtused [58].

$$D_h = k_B T / 3\pi\eta D_d \quad (6)$$

Antud vörrandis D_h tähistab hüdrodünaamilist diameetrit, T temperatuuri, k_B on Boltzmanni konstant, η on vedeliku dünaamiline viskoossus ning D_d on mõõtmise tulemusena saadud difusioonikoefitsient. Footonkorrelatsioon-spektroskoopia eeliseks on meetodi lihtsus ja kiirus ning võimalus mõõta osakeste suurst, mille diameeter on vähemalt 0.6 nm [58].

2.4.4. Infrapunasppektroskoopia

Infrapunasppektroskoopia on võnkespektroskoopia meetod, kus mõõdetakse infrapunase valguse neeldumist uuritavas aines. Infrapunanevalgus on elektromagnetkiirgus, mille lainepikkus jääb ligikaudu vahemikku 700 nm kuni 1 mm. Antud meetod põhineb teadmisel, et molekulid neelavad vaid teatud resonantssagedusel võnkuvaid laineid. Nimetatud sagedus sõltub molekulis olevatest kovalentsidemetest, mis vastava kiirguse neeldumisel ergastuvad. Kuna erinevatel sidemetel on resonantssageduse väärtus erinev, siis on neeldumisspektri järgi võimalik tuvastada, milliseid keemilisi sidemeid antud materjalis leidub. Seega on infrapunasppektroskoopia rakendatav proovi keemilise koostise kindlakstegemiseks. Antud meetodi loomusest tingituna ilmutavad end spektris vaid infrapuna-aktiivsed võnkumised ehk võnkumised, mille käigus molekuli dipoolmoment muutub. Sellest hoolimata on tegu kiire ning mittedestruktiivse karakteriseerimismeetodiga, millega on võimalik analüüsida erinevates agregaatolekutes aineid.

Käesoleva töö eksperimentaalses osas on kasutatud nõrgendatud täieliku sisepeegelduse, Fourier' teisendusega infrapunast spektroskoopiat ehk ATR-FT infrapunasppektroskoopiat. Antud erimeetod põhineb täieliku sisepeegelduse nähtusel ATR-kristallis, mille peale asetatakse proov. Kristalli sisemusest juhatakse uuritava aine pinnale infrapunakiirgust kriitilise nurga all, et toimuks sisepeegeldumine. Osa antud kiirgusest läbib õhukest kihti proovis ning seejärel peegeldub tagasi. Tagasipeegeldunud kiirgus suunatakse detektorisse, mille tulemusena saame aine neeldumisspektri. Fourier' teisendust rakendatakse spektri mõõtmisel, et seeläbi kiirendada mõõtmisprotsessi ning parandada spektri kvaliteeti läbi signaali-müra suhte suurendamise. ATR infrapunasppektroskoopia eeliseks on lihtsus, sest proovi ei ole tarvis ette valmistada ning spektreid saab mõõta nii tahkistest kui vedelikest.

2.5. Raudoksiidsete nanoosakeste rakendused

2.5.1. Magnetresonantstomograafia

Magnetresonantstomograafia on laialt levinud kujutiste tekitamise meetod, mis suudab eristada patoloogilist ning tervet kude, põhinedes vesiniktuumade relaksatsiooni omadustele vees. Erinevate keha sisemiste struktuuride paremaks eristamiseks manustatakse kontrastainet. Enim kasutatakse selleks gadoliiniumil baseeruvaid segusid, kuid antud ühendi puudusteks on Gd^{3+} ionide potentsiaalne mürgisus, madal relaksiivsus ja lühike poolväärtusaeg [59]. Tänu superparamagnetilistele omadustele, kõrgele relaksiivsusele, stabiilsusele, biosobivusele ning pinna funktsionaliseerimise võimalusele on nendele sobivaks asenduseks raudoksiidsed nanoosakesed. Nende aplitseerimine võimaldab avastada progresseeruvat haigust juba varajases staadiumis. Sobiva kontrastaine kasutamine võimaldab visualiseerida erinevaid rakutüüpe ning isegi molekule [60].

Praeguseks on turul mitmeid tooteid, mis koosnevad 3 - 6 nm suurustest raudoksiidsetest tuumadest ning 20 – 150 nm hüdrodünaamilise diameetriga dekstraani kattest, mis on saanud loa *in vivo* kasutamiseks MRT kontrastainena. Mõned näited on Feridex, GastroMark, Combidex ja Sinerem. [61]

Kuna inimkeha on veerikas süsteem muutub *in vivo* rakendustes raudoksiidse osakese hüdrodünaamiline suurus palju tähtsamaks kui kuiva oleku suurus. Seetõttu klassifitseeritakse raudoksiidsetel osakestel põhinevad kontrastained hüdrodünaamilise diameetri järgi kaheks. Osakesi, mille hüdrodünaamiline suurus on üle 40 nm nimetatakse väikesteks raudoksiidi osakestest ning osakesi, mille hüdrodünaamiline suurus on alla 40 nm nimetatakse üliväikeseks raudoksiidi osakesteks [62].

Makrofaagisüsteem võtab väikesed raudoksiidi osakesed kiiresti enda sisse ning need kogunevad seejärel maksa või põrna, kuna antud organite töö on puhastada verd võõrkehade eest. Seetõttu ongi väikeseid raudoksiidi osakesi valdavalt arendatud kahjustuste ja kasvaja avastamiseks maksas. Kaks antud nähtusel põhinevat juba müügil olevat kontrastainet on eelmainitud GastroMark ning Feridex.

Üliväikesed raudoksiidi osakesed ei kogune oma suuruse tõttu makrofaagisüsteemi nii kiiresti, vaid püsivad kauem vereringluses. On leitud, et raudoksiid-nanoosakesed, mis on väiksemad kui 10 nm kogunevad lümfisõlmedes, tekitades seal hüpointensiivse signaali [63].

Tänu sellele on võimalik kasutada üliväikeseid raudoksiid-nanoosakestel baseeruvaid kontrastaineid lümfi sõlmede metastaaside uurimiseks.

Lee *et al.* kasutasid üliväikeste raudoksiidsete osakeste vereringluses püsimise pikka kestvust, et avastada rinnakasvajat *in vivo*, kasutades selleks loodud Fe₃O₄ nanoosake-hertseptiin sondi. [64]

2.5.2. Magnetiline hüpertermia

Magnetiline hüpertermia on vähiravimeetod, mis põhineb magnetiliste nanoosakeste kuumenemisel vahelduvas välises magnetväljas. Selleks manustatakse magnetilisi nanoosakesi, mis satuvad rakkudesse endotsütoosi teel ning kuhjuvad sealsetes vesiikulites [65]. Välise kõrgsagedusliku vahelduva magnetvälja rakendamisel antud osakesed kuumelevad tänu Néeli ja Browni relaksatsioonist tingitud soojuslikele kadudele [65]. Lokaalne temperatuuri-tõus põhjustab vähiraku surma ilma ümbritsevat kudet oluliselt kahjustamata. Magnetilisi nanoosakesi sisaldav vähirakk näitab apoptoosile (programmeeritud rakusurmale) iseloomulike tunnuseid temperatuurivahemikus 41 °C - 47 °C ning nekroos (programmeerimata rakusurm) toimub temperatuuridel üle 50 °C [65].

Hüpertermiat rakendatakse koos teiste vähiravimeetoditega, et ravi efektiivsust suurendada. Uuring, mis koosnes 112 ajukasvajaga patsiendist, näitas, et katseisikud, keda oli ravitud kiiritusteraapiaga ning hüpertermiaga elasid kaks korda kauem kui need, kes said ainult kiiritusravi [66].

Rosensweig näitas, et kuumutamiskiirus sõltub tugevasti superparamagnetilise nanoosakese suurusest [67]. Monodispersse magnetiit-nanoosakeste korral täheldas ta kuumutamiskiiruse järsku tõusu 14 nm diameetriga osakeste korral. Antud väärtus ei sõltunud rakendatud magnetvälja intensiivsusest. Samuti näitasid Rosensweigi arvutused, et osakeste suurusjaotuse laienemine põhjustab järsku kuumutamiskiiruse languse. Seega on kriitilise tähtsusega leida sobiv meetod monodispersse jaotusega ning kõrge bioühilduvusega superparamagnetiliste nanoosakeste sünteesiks.

Yallapu *et al.* lõi vesilahustuvad superparamagnetilised nanoosakesed, mida saab kasutada korraga magnetresonantstomograafias, hüpertermias ning ravimite kehasiseseks transpordiks. Osakesed sünteesiti kaassadestamise meetodil ning kaeti β-tsüklodekstriiniga ning poloksameeriga. Antud osakesed on kõrge stabiilsuse ja rakulise omastatavusega,

suurendavad magnetresonantstomograafias loodava kujutise kontrasti ning kuumenevad välises vahelduvas magnetväljas kiiresti. [68]

2.5.3. Ravimite suunamine

Ravimite suunamine on farmakoteraapias kasutatav kaasaegne protseduur, mis võimaldab mõjutada ravimite liikumist organismi kehas. Eriti atraktiivne on antud meetod keemiaravis, kus kasvaja ravimisel jaotub kasutatud medikament terve inimese keha peale, põhjustades mitmeid negatiivseid kõrvalmõjusid. Ravimite suunamine võimaldab neid mõjusid vältida, tagades ravimite liikumise ainult soovitud kohta, nende püsimise seal ning seega vähendades ka kasutatavat doosi.

Raudoksiidsete nanoosakeste superaparamagnetilised omadused ning võimalus siduda pinnakatte külge ravimeid teeb neist eelistatud materjali ravimite transpordiks. Neid on võimalik suunata haiguskoldesse kasutades selleks välist magnetvälja. Antud protsessi juures on kriitilise tähtsusega osakeste suurusjaotus, pinnakeemia ning magnetilised omadused. On leitud, et osakesed, mille diameeter on üle 100 nm, eemaldatakse makrofaagisüsteemi poolt kiiresti vereringlusest, mis takistab nende kasutamist ravimikandjana [69]. Teisalt, kui osakeste diameeter jääb alla 10 nm eemaldatakse need neerude poolt [69]. Seega on optimaalseim suurus 10 – 100 nm, sest antud mõõtmete juures suudab osake ka kehas olevaid väikesed kapillaare läbida [37]. Lisaks on raudoksiidsete nanoosakeste efektiivsust kerge jälgida, uurides osakeste jaotust kehas magnetresonantstomograafiaga. 2011. aastal läbiviidud uuring näitas, et välise magnetvälja abiga jõuab 6 kuni 10 korda rohkem ravimit kasvajakoldesse [70].

Lübbe *et al.* süstisid epirubitsiiniga ühendatud 100 nm diameetriga raudoksiid nanoosakesed kopsuvähiga ning neerurakulise vähiga rottide reieveeni välises magnetväljas tugevusega 0.2 T. Nad avastasid, et kogus, mis oli 5 % roti verehulgast, põhjustas täieliku kasvaja taandumise. Samas oli kasvaja taandumist täheldada ka 0.5 % kogusega. Täheldatavad kõrval efektid olid minimaalsed ning esinesid doosidega, mis ületasid 10 % roti keha verehulgast. Nimetatud kõrval efektid olid unitõbi, vähenenud toidu tarbimine ning kasvaja juures oleva naha hallikaks muutumine. [71]

Esimesed inimkatsed tehti 1996. aastal Lübbe *et al.* poolt, kus 14 patsienti manustas erinevates kogustes epirubitsiiniga ühendatud raudoksiid nanoosakesi. Tulemused näitasid, et ravimid suudeti edukalt kasvajakoldesse suunata vaid pooltel patsientidel.

Kõrvalefektidena esines osadel patsientidel naha hallikaks muutumine kasvaja ümbruses ning ühel patsiendil esinesid külmavärinaid. Raudoksiidsete nanoosakeste kuhjumist maksas ei täheldatud, mis viitab nende kasutamise turvalisusele ravimite transpordil. [72]

2.5.4. Katalüsaatorid

Katalüsaator on aine, mis kiirendab keemilise reaktsiooni toimumist ning vähendab selleks kuluvat energiat. Katalüsaatorit nimetatakse homogeenseks, kui ta on samas faasis lähteainetega ning heterogeenseks, kui ta on erinevas faasis. Homogeense katalüsaatori eeliseks on suurem reaktsioonikiirus, kuid erinevalt heterogeensest katalüsaatorist on teda väga keeruline reaktsioonikeskkonnast eemaldada. Seetõttu kasutab enam kui 80 % vastavast tööstusest heterogeenseid katalüsaatoreid, hoolimata nende keemilisest ebaefektiivsusest [73]. Taaskasutamise võimaluse puudumine on kriitiline probleem, sest katalüsaatorid on üldiselt väga kallid.

Heterogeensete katalüsaatorite korduvkasutamise võimaldamiseks seotakse need magnetiliste nanoosakeste külge. Tänu superparamagnetilistele omadustele on võimalik katalüsaatorid reaktsioonisegust kokku koguda ning välise magnetvälja eemaldamisel disperseeruvad nanoosakesed taas stabiilselt segusse. Lisaks on antud osakeste eeliseks suur eripind, mis kiirendab reaktsioonikiirust veelgi. Seetõttu on nanosuuruses raudoksiidsed osakesed märgatavalt efektiivsemad kui mikromõõtmetes osakesed [74].

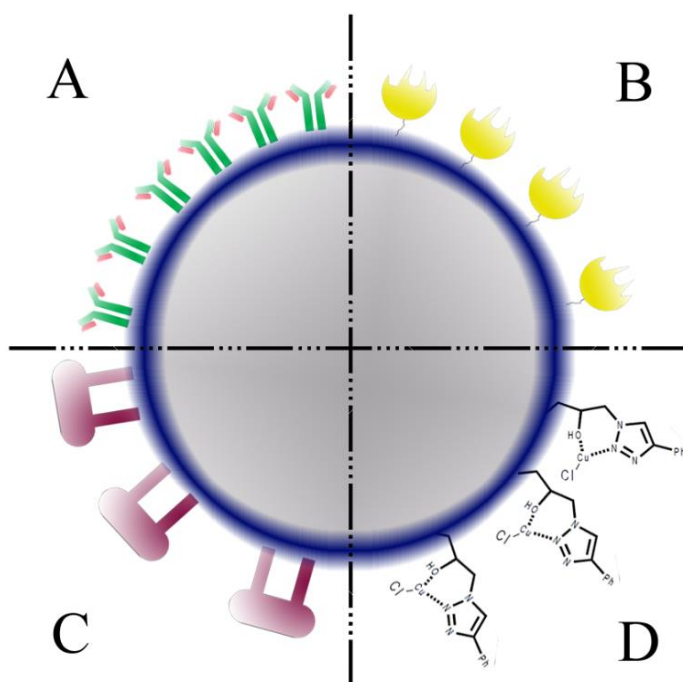
Magnetiit- ning hematiit-nanoosakesi kasutatakse katalüsaatorina mitmetes olulistes tehnoloogilistes protsessides, näiteks NH_3 sünteesis (Haberi protsess), vee ja gaasi vahetusreaktsioonis, maagaasi desulfureerimises, alkoholide oksüdeerimises ning butadieeni masstootmises [4] [75] [76].

Eraldi tähtsa rakendusena võib välja tuua kasutuse hüdrogeenimises, mis on protsess, mille käigus keemilisele elemendile või ühendile lisatakse molekulaarne vesinik. Hüdrogeenimist kasutatakse peenmetalli tootmiseks, söetööstuses söe vedeldamiseks ning toidutööstuses küllastunud rasvade tootmiseks. Ying *et al.* sünteesisid silaankattega silaanitud hematiidi nanoosakesed mikroemulsioonimeetodil ning funktsionaliseerisid antud osakesed amiiniga, mille külge sidusid omakorda pallaadium nanoosakesed [77]. Saadud ühendit $\text{Pd}/\text{NH}_2\text{-SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ kasutati nitrobenseeni katalüütiliseks hüdrogeenimiseks. Kasutatud katalüsaatoriga saavutati pea viiekordne reaktsioonikiirus võrreldes kommertsliku Pd/C katalüsaatoriga

(vastavalt $0.39 \mu\text{mols}^{-1}$ ning $0.08 \mu\text{mols}^{-1}$). Samuti takistas see pallaadium-nanoosakeste agregeerumist ning võimaldas osakesed taaskasutamiseks magnetiliselt kokku koguda.

2.5.5. Käesolevas töös sünteesitud nanoosakeste planeeritud rakendused

Eelnevates peatükkides anti ülevaade superparamagnetiliste raudoksiidsete nanoosakeste enimlevinud rakendustest. Käesoleva peatüki eesmärk on välja tuua mõned konkreetsemad kasutusala, milles planeeritakse rakendada antud projekti raames loodavaid nanoosakesi. Spetsiifilise rakenduse jaoks on tarvis ka osakest vastavalt funktsionaliseerida. Näited mõningatest ühenditest, mida teatud konkreetse rakenduse jaoks on võimalik raudoksiidse nanoosakese külge siduda, on toodud joonisel 3.



Joonis 3. Näide erinevate rakenduste jaoks funktsionaliseeritud pinnakattega nanoosakesest. A – antikehad; B – ensüümid; C – madalmolekulaarsed ühendid; D – katalüsaatorrühm.

Üheks innovaativsemaks kasutusala on bioaktiivse pesupulbri loomine, mida on võimalik korduvkasutada. Antud rakendus põhineb raudoksiidsetel nanoosakestel, mille külge on seotud ensüümid, mis võimaldavad antud ainel puhastada pesumasinas olevaid riideid. Pärast pesutsükli on tänu nende magnetilistele omadustele võimalik kasutatud pesuaine püsimagnetiga kokku koguda ning uuesti kasutada. Antud meetodikat arendab Tartu

Ülikooli spin-off ettevõtte GreenBead, mis pälvis vastava ideega võidu rahvusvahelise kvaliteediinnovatsiooni konkursil Stockholmis [78].

Loodavaid nanoosakesi planeeritakse rakendada projektis „Mobiilne sensorsüsteem glüfosaadijääkide kiireks määramiseks veekogudes ja pinnavees,” mille partnerid on Keemia Instituudi kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool (Toonika Rinken, PhD) ning Keskkonnaministeeriumi Keskkonnaamet. Antud projekti eesmärk on välja töötada superparamagnetiliste nanoosakeste abil biosensorid, mida saaks kasutada glüfosaadi *in situ* detekteerimiseks ning seejärel oleks võimalik kasutatud biosensorid magnetiliselt kokku koguda. Nimetatud rakendus on aktuaalne, sest glüfosaat on Euroopia Liidus liigitatud keskkonnale ohtlike ainete klassi ning võib keskkonda sattudes kujutada ohtu elusorganismidele. Tegu on tegu enim kasutatava pestitsiidiga maailmas [79].

Sünteesitavaid raudoksiidseid nanoosakesi planeeritakse arendada katalüsaatoritena kasutamiseks klikk-keemias (ingl. k *click chemistry*). Tegu on keemilise sünteesi kontseptsiooniga, mis kirjeldab kõrge reaktsioonikiiruse ja saagikusega ning lihtsa meetodikaga reaktsioone. Kattes käesoleva projekti raames sünteesitud superparamagnetilised nanoosakesed vase kompleksühendiga saame klikk-keemilisteks rakendusteks sobiva katalüsaatori, mida on võimalik magnetiliselt kokku korjates taaskasutada.

Samuti on sisulist huvi raudoksiidsete nanoosakeste vastu näidanud biotehnoloogiafirma Icosagen Cell Factory OÜ planeeritava projekti "Antikehade ja superparamagnetiliste osakeste konjugaatide loomine" raames. Antud firma on huvitatud antikehade sidumisest sünteesitud nanoosakeste külge ning vastavasuunalisest arendustööst. Partneri huvidest tulenevalt ei kuulu loodud osakeste edasist kasutamist puudutavad detailid avalikustamisele.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Eksperimentides kasutatud ained ja seadmed

3.1.1. Eksperimentides kasutatud ained

Eksperimentides kasutati järgnevaid kemikaale:

- Vesinikkloriidhape HCl, tootja Sigma-Aldrich, katalooginumber 30721-2.5L
- Isopropanool (CH₃)₂CHOH, tootja Sigma-Aldrich, katalooginumber 24137-2.5L-R
- Heptaan C₇H₁₆, tootja Fluka Analytical, katalooginumber 51760-2.5L
- Ksüleen C₆H₄(CH₃)₂, tootja Kemet RV
- Tetraetüülortosilikaat Si(OC₂H₅)₄, tootja Acros Organics, katalooginumber 420360010
- Ammooniumhüdroksiid NH₄OH, tootja Sigma-Aldrich, katalooginumber 338818-5ML
- Heksaan C₆H₁₄, tootja Sigma-Aldrich, katalooginumber 208752-2.5L
- Toluene C₆H₅CH₃, tootja Lach-Ner
- Rauddikloriid FeCl₂ valmistati Monaghani ning Fanningu esitatud protokoll järgi, põhinedes Paslode toodetud raudnaelte reaktsioonil vesinikkloriidhappega [80]
- Raudtrikloriid FeCl₃, tootja Fisher Chemical, katalooginumber 10025-77-1

3.1.2. Eksperimentides kasutatud seadmed

3.1.2.1. Skaneeriv elektronmikroskoop

Nanoosakeste visualiseerimiseks kasutati TÜFI nanostruktuuride füüsika labori skaneerivat elektronmikroskoopi FEI Nova NanoSem 450 (vt. lisa 1). Antud seadme resolutsioon madalpingel piisava vaakumi korral on 1.4 nm. Mõõtmised sooritati kiirendava pinge vahemikus 3-10 kV ning suurendusega kuni 350 000 korda. Proovide ettevalmistamiseks kasutati vurrkatmise meetodit. Uuritavat ainet pipeteeriti eelnevalt puhastatud vurrkatturil pöörlevale räniplaadile. Pöörlemise lõppedes tõsteti ränialus koos prooviga ahju, et

kiirendada solvendi aurustumist. Piisava aja möödudes oli võimalik nanoosakesi skaneerivas elektronmikroskoobis uurida, ilma sealset vaakumit rikkumata.

3.1.2.2. Transmissioonelektronmikroskoop

Lisaks kasutati nanoosakeste visuaalseks karakteriseerimiseks ka Tartu Ülikooli Molekulaar ja Rakubioloogia Instituudile kuuluvat transmissiooni elektronmikroskoopi FEI Tecnaï G2 Spirit Biotwin (vt. lisa 2). Seade opereerib pingetevahemikus 20 kV kuni 120 kV, suudab saavutada kuni 300 000-kordse suurenduse ning võimaldab luua uuritavast objektist ka 3D kujutise. Nimetatud mikroskoopi on võimalik konfigureerida kasutamiseks ka skaneeriva transmissioonelektronmikroskoobina. Uuritav proov pipeteeriti eelnevalt spetsiaalsele vasest valmistatud ja süsinikkilega kaetud võrgule, mille eesmärk on mõõtmise vältel juhtida eemale kiirendatud elektronide poolt tekitatud elektrostaatilisest laengust ning soojust.

3.1.2.3. Footonkorrelatsioonspektromeeter

Osakeste suurusjaotuse määramiseks suspensioonis kasutati footonkorrelatsioonspektromeetrit Malvern Zetasizer Nano ZSP (vt. lisa 3). Antud seade mõõdab osakestelt tagasi hajunud valguse abil nende omadifusiooni ning arvutab Stokes-Einstein võrrandi kaudu nanoosakeste suurus. Seade võimaldab mõõta osakesi suurusvahemikus 0.3 nm kuni 10 mikronit ning minimaalne mõõdetav suspensiooni maht on 12 µl. Mõõtmiseks tuli eelnevalt osakeste suspensiooni lahjendada, sest antud seadme mõõtemetoodika ei võimalda liialt kõrge kontsentratsiooniga proovi korral korrektseid tulemusi saada. Lahjendamise järgselt paigutati osakeste suspensioon spetsiaalsesse klaasist küveti, mis asetati mõõtmiseks footonkorrelatsioonspektrometrisse.

3.1.2.4. Infrapunasektromeeter

Infrapunasektrite mõõtmiseks kasutati infrapunasektromeetrit Bruker Platinum Vertex 70, millele oli täieliku sisepeegeldumise võimaldamiseks lisatud Bruker Platinum ATR lisaseade (vt. lisa 4). Antud instrumendiga on kristallina kasutatud teemantit ning mõõtmisi on võimalik läbi viia piirkonnas $8000 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Nimetatud katseseadmega mõõdeti kõigi sünteesiproovide neeldumisspektrid. Osakesed mõõdeti suspensioonina, nende eelnev

töötlemine ei olnud vajalik. Kirjandusele baseerudes valiti kõigi proovide jaoks mõõtmisvahemikuks 4000 cm^{-1} kuni 400 cm^{-1} .

3.1.2.5. Sonikaatorid

Sonikeerimine on erinevate nanoosakeste sünteesimeetodite puhul laialdaselt kasutatav meetod, mis võimaldab disperseerida osakesed lahuses ning takistab nende aglomeerumist. Nanoosakeste sonikeerimiseks kasutati kahte erinevat ultraheliseadet.

Madalamal võimsusel sonikeerimiseks kasutati ultrahelivanni SONOREX Digital 10 P, mis on toodetud firma Bandelin poolt (vt. lisa 5). Antud sonikaator genereerib sagedust 35 kHz , võimaldab reguleerida temperatuuri vahemikus $20\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mahutab kuni 3 L vedelikku ning tekitab kõrgsageduslikku heli võimsustel $12\text{--}120\text{ W}$. Nanoosakeste disperseerimiseks lahuses asetati need suletud kolvis paiknevana ultrahelivannis olevasse vette.

Kõrgematel võimsustel sonikeerimiseks kasutati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis olevat ultrahelisondi Bandelin Sonopuls HD 2070. Antud seadmega on võimalik korraga sonikeerida kuni 200 ml proovi ning see tekitab kõrgsagedusliku heli võimsusvahemikus $7\text{--}70\text{ W}$ ja sagedusel 20 kHz . Sondina kasutati mudelit MS 73 (#529), mille pikkuseks on 529 mm ning ava diameetriks 3 mm .

3.1.2.6. Tsentrifuug

Sünteesitud nanoosakeste väljasadestamiseks lahusest kasutati Heraeus Multifuge X1R (Thermo Scientific) tsentrifuugi (vt. lisa 6). Tsentrifugimine on vajalik nanoosakeste väljasadestamiseks loodud suspensioonist. Antud tsentrifuug võimaldab pöörelda sagedusel 15200 pööret minutis, genereerida 25830 -kordse raskuskiirenduse ning reguleerida temperatuuri vahemikus $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuni $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antud eksperimentide korral kasutati tsentrifuugi toatemperatuuril ning 10000 G kiirendusega.

3.2. Raudoksiidsete nanoosakeste süntees

3.2.1. Termolüüsi meetod

Antud töös kasutatud nanoosakeste sünteesimeetod põhineb Yu *et al.* publitseeritud artiklil [30]. Reaktsioonis kasutati katseskeemi, mis on illustreeritud töö lisades (lisa 7). Reaktsioon toimus 300 ml mahuga kolmekaelalises ümarapõhjalises kolvis, mille kaeladesse paigutati tagasijooksuga jahutid, et tagada segu tagasikeetmine. Temperatuuri jälgimiseks ja reguleerimiseks kasutati kuumutusmantlit, mis paiknes kolvi all ning termoelektrilist termomeetrit, mis paigutati segusse läbi ühe äärmise kolvikaela. Reaktsioonisegu segamiseks kasutati mehaanilist segajat koos segamisvardaga, mis asetati läbi keskmise kolvikaela. Kolmas kael suleti polümeermaterjalist korgiga hermeetiliselt.

Raua lähteainena kasutatud $\text{FeO}(\text{OH})$ (7.48 g) segati ümarapõhjalises kolvis kokku oleiinhappega (94.92 g) ning 1-oktadetseeniga (210 g). Antud segu kuumutati $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ni ning hoiti konstantsel temperatuuril mehaaniliselt segades 50 minutit. Selle aja jooksul muutus algselt must-pruunikas segu selgeks pruuniks. Seejärel kuumutati segu $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatuuril üks tund, mille jooksul see muutus mustaks. Raudoksiidsete nanoosakeste ekstraheerimiseks viidi toatemperatuurini jahtunud reaktsioonisegu 8x50 ml mahuga tuubidesse. Igasse tuubi lisati 10 ml reaktsioonisegu ja 40 ml isopropanooli, mis segati tuube raputades. Seejärel segu tsentrifuugiti 10000 G juures ühe minuti. Tsentrifugimise järel läbipaistev supernatant eemaldati ja lisati uus kogus isopropanooli. Isopropanooliga ekstraheerimist korrati 7 korda ning saadud osakeste hoiustamiseks disperseeriti need heptaanis.

3.2.2. Kaassadestamise meetod

Antud töös kasutatud meetod baseerub Moghaddami *et al.* esitatud sünteesiprotokollil [81]. Reaktsioonis kasutati katseskeemi, mis on välja toodud töö lisades (lisa 8). Reaktsioon toimus 100 ml mahuga kolmekaelalises ümarapõhjalises kolvis, mis oli kinnitatud magnetsegaja kohale. Inertse keskkonna loomiseks juhiti reaktsiooni kestel äärmise kolvikaela kaudu keskkonnast läbi lämmastiku. Teise äärmise kaela kaudu sisestati segusse pH-meeter. Keskmise kaela kaudu tilgutati katsesegusse ammooniumhüdroksiidi.

Reaktsiooni alustamiseks lisati kolbi eelnevalt kokku segatud FeCl_3 (10.8 g) ning FeCl_2 (4.0 g) segu, mis oli lahustatud destilleeritud vees (50 ml). Lahustumise ühtlustamiseks lisati segusse magnetsegaja pulk ning lülitati tööle magnetsegaja. Aluselise keskkonna loomiseks

tilgutati segusse ammooniumhüdroksiidi kuni pH-tase jõudis kümneni. Saadud lahust segati toatemperatuuril 30 minutit. Tekkinud magnetiliste nanoosakeste puhastamiseks pesti osakesi destilleeritud veega (3x30 mL) ning seejärel isopropanooliga (50 mL), milles osakesed ka hoiustati. Osakeste kogumiseks pesude vahel kasutati neodüümmagnetit magnetilise induktsiooni väärtusega 0.4 T.

3.3. Funktsionaliseerimine

Termolüüsi meetodil sünteesitud osakesed funktsionaliseeriti Bloemen *et al.* avaldatud artiklil baseeruva protokoll põhjal [54]. Selleks segati Erlenmeyeri kolvis 100 mg eelnevalt sünteesitud isopropanoolis olevad nanoosakesed 50 ml ksüleeniga. Antud segule lisati 2.5 ml trietüülamiini, 0.05 ml MilliQ vett ning 0.5 ml tetraetüülortosilikaati. Kolb paigutati seejärel kaheteistkümneks tunniks ultrahelivanni. Vannivee temperatuuri hoiti sonikeerimise käigus 50 °C juures. Vastav katseskeem on välja toodud töö lisades (lisa 9). Hiljem sadestati silaanitud osakesed neodüümmagnetiga kolvi põhja ning neid pesti ksüleeniga (5x25 ml) ja seejärel isopropanooliga (5x25 ml). Antud osakeste kogumine magnetiga oli komplitseeritud, rakendada tuli suurt magnetvälja gradienti. Saadud osakesed lahtustati hoiustamiseks MilliQ vees, millele lisati 40%-ni etanooli.

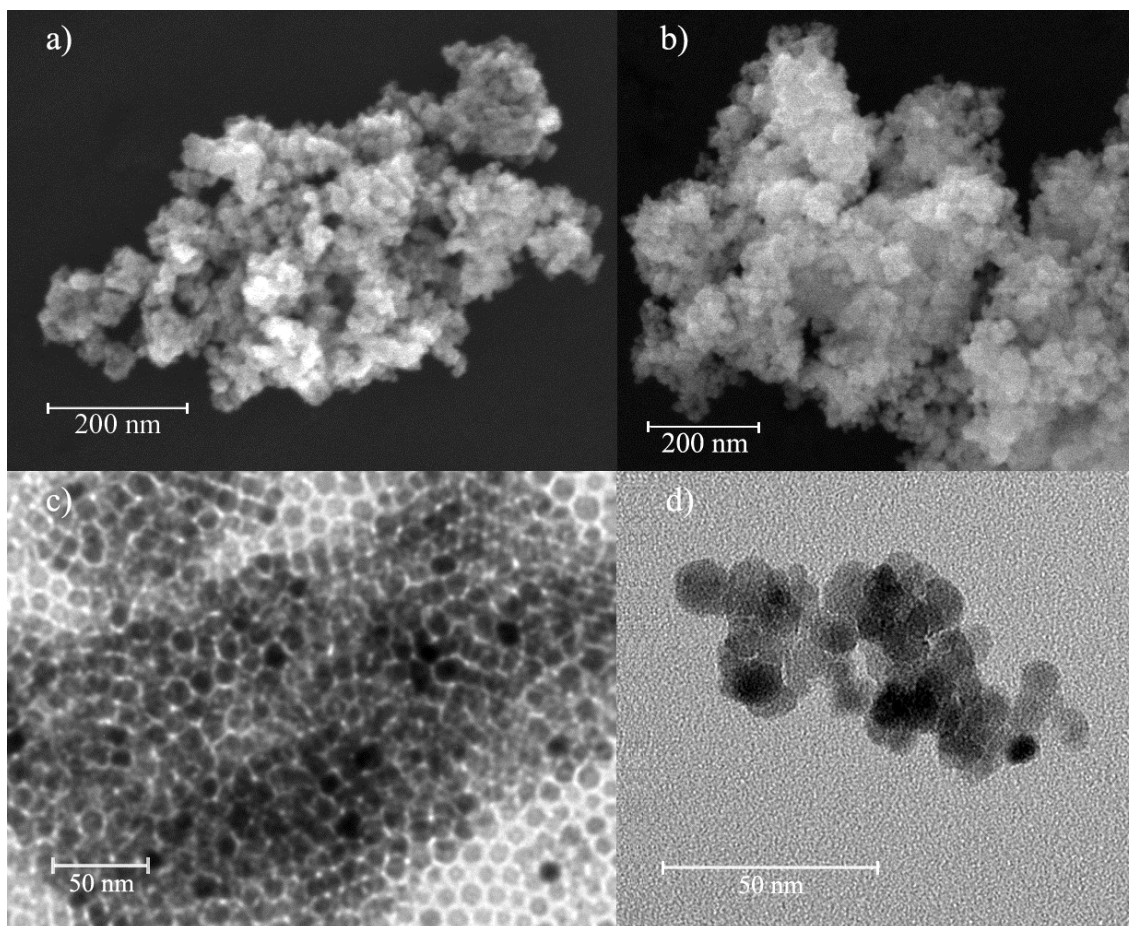
Kaassadestamise meetodil sünteesitud osakeste funktsionaliseerimiseks kasutati Moghaddam *et al.* avaldatud protokoll [81]. Osakeste katmiseks silaaniga valati 80 ml isopropanooli koos selles disperseerunud nanoosakestega ümarapõhjalisse klaaskolbi, millesse lisati 3 ml tetraetüülortosilikaati. Seejärel tilgutati süstlaga segusse 15 minuti jooksul 3 ml ammoniumhüdrosüüdi, samal ajal lahust mehaaniliselt segades. Antud segu hoiti 40 °C juures ning segati mehaaniliselt järgnevat 12 tundi. Loodud silaankattega magnetilised nanoosakesed koguti kokku neodüümmagneti abil ning pesti isopropanooliga (3x30 ml), milles osakesed ka hoiustati. Võrreldes termolüüsi meetodil sünteesitud osakestega olid antud nanoosakesed magnetiga hõlpsasti kogutavad.

4. Tulemused ja analüüs

4.1. Elektronmikroskoopia

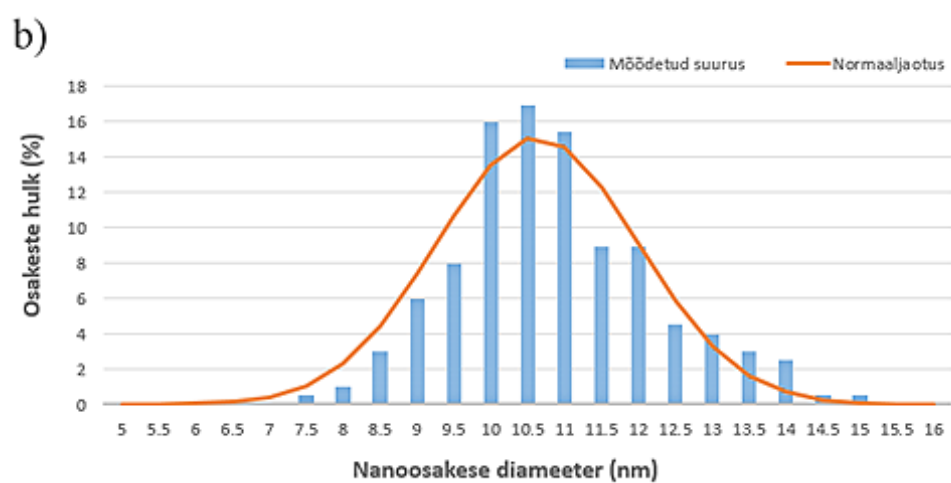
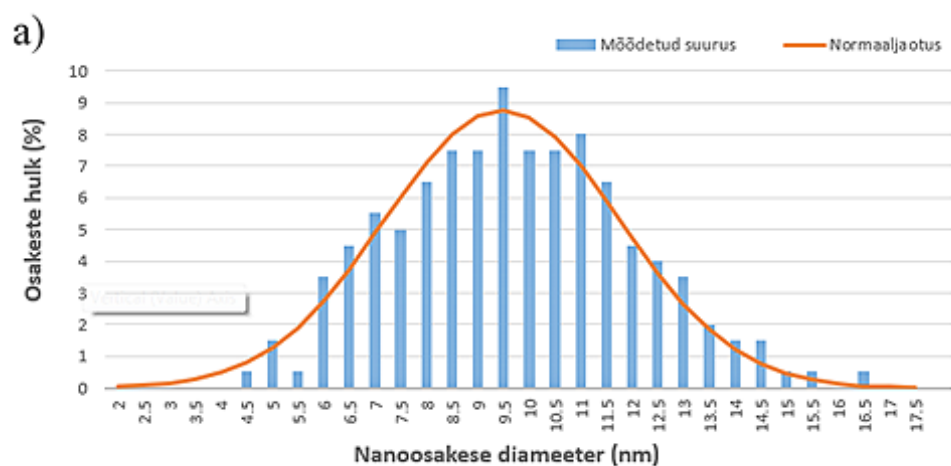
Loodud nanoosakeste vahetuks iseloomustamiseks kasutati skaneerivat elektronmikroskoopi. Loodud kujutised on välja toodud joonisel 4 (a, b). Pildid kinnitasid sfääriliste nanoskaalas osakeste olemasolu proovis. Silaankihiga ning silaanimata termolüüsi meetodil sünteesitud osakesed paistavad visuaalselt väga sarnased. Proovis võib täheldada agregeerunud osakesi, kuid tekkinud agregaadid on mõõduka suurusega ehk jäävad nanomõõtmetesse. Piltidelt ei ole võimalik kindlaks määrata, kas osakest kattev silaankiht on ühtlane või moodustab ristsidemeid teiste silaani kihtidega.

Osakeste edasiseks visuaalseks karakteriseerimiseks kasutati transmissiooni elektronmikroskoopi, mis kinnitas osakeste ligikaudu sfäärilist kuju. Loodud kujutised on esitatud joonisel 4 (c, d). TEM-iga loodi kujutised nii termolüüsi meetodil valmistatud osakestest, mis paiknesid heksaanis, kui ka termolüüsi meetodil saadud osakestest, mis olid disperseeritud vette. Vaadeldavad osakesed on elektrontihedad ning neid on võimalik üksikuna visualiseerida. Kahte tüüpi osakeste vahel ilmneb selge erinevus, termolüüsi meetodil loodud osakesed on ühtlase suurusjaotusega ning moodustanud aluse peale võrgu, kuid kaassadestamise meetodil loodud osakesed on kõrgema polüdisperssusega ning agregeerunud. On võimalik, et antud osakesed võisid moodustada agregate vasest võrgu peal kuivamise käigus. Täiendavad transmissioonelektronmikroskoobiga loodud kujutised on välja toodud käesoleva töö lisades (vt. lisa 10 ja 11).



Joonis 4. SEM-i pilt silaanitud termolüüsi meetodil sünteesitud nanoosakestest (a) ja funktsionaliseerimata termolüüsi meetodil saadud nanoosakestest (b) ning TEM-i pilt termolüüsi meetodil valmistatud silaanimata nanoosakestest (c) ja kaassadestamise meetodil valmistatud nanoosakestest (d).

Nanosakeste suuruse kvantitatiivseks hindamiseks kasutati vabavaralist arvutiprogrammi ImageJ, millega mõõdeti piisavalt kontrastsete osakeste pindalad ning sfäärilise lähenduse abil arvutati nendele vastavad diameetrite väärtused. Antud meetodiga oli võimalik mõõta vaid nanoosakese raudoksiidse tuuma suurust, kuna pindis ei ole üldiselt TEM-i piltidel nähtav. Mõõdetud suurusjaotus on toodud histogrammidena joonisel 5. Termolüüsi meetodil loodud osakeste läbimõõdu keskväärtuseks saadi 10.65 nm, standardhälbeks 1.34 nm. Kaassadestamise meetodil sünteesitud osakestel oli vastavateks väärtusteks 9.47 nm ning 2.27 nm. Antud mõõtmised on toodud üksikute nanoosakeste, mitte moodustunud agregaatide jaoks. Seega saab statistilist kinnitust eelnev väide, et termolüüsi meetodil sünteesitud nanoosakeste suurusjaotus on kitsam kui kaassadestamise meetodil sünteesitud nanoosakestel. Toodud graafikutelt on näha, et mõlemat tüüpi osakeste suurusjaotused alluvad visuaalsel vaatlusel üsna hästi vastavatele normaaljaotustele.



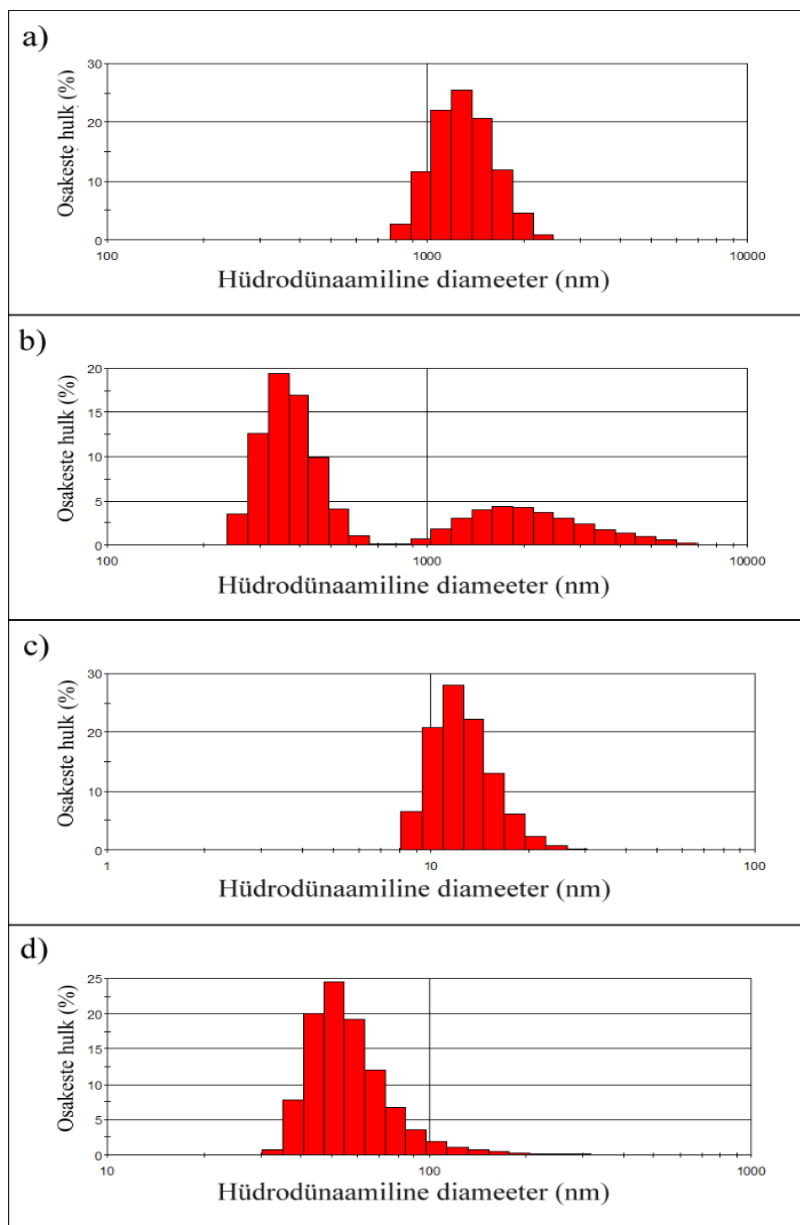
Joonis 5. Kaassadestamise meetodil (a) ning termolüüsi meetodil (b) sünteesitud nanoosakeste suurusjaotus histogrammina. Võrdlusena toodud normaaljaotus.

4.2. Footonkorrelatsioonspektromeetria

Eelnevalt saadud suurusjaotuse kinnitamiseks mõõdeti osakeste suurused ka footonkorrelatsioonspektromeetriga. Mõõtmised viidi läbi mõlema sünteesimeetodi nii silaanitud kui silaanimata variandiga ning monodisperssuse tagamiseks kõiki proove eelnevalt sonikeeriti. Mõõtmistulemused on histogrammidena esitatud joonisel 6. Erinevalt TEM-iga tehtud mõõtmistest saadakse DLS meetodil mõõtes tulemuseks nanoosakese hüdrodünaamilise läbimõõdu, mis võib klassikalisest läbimõõdust erineda.

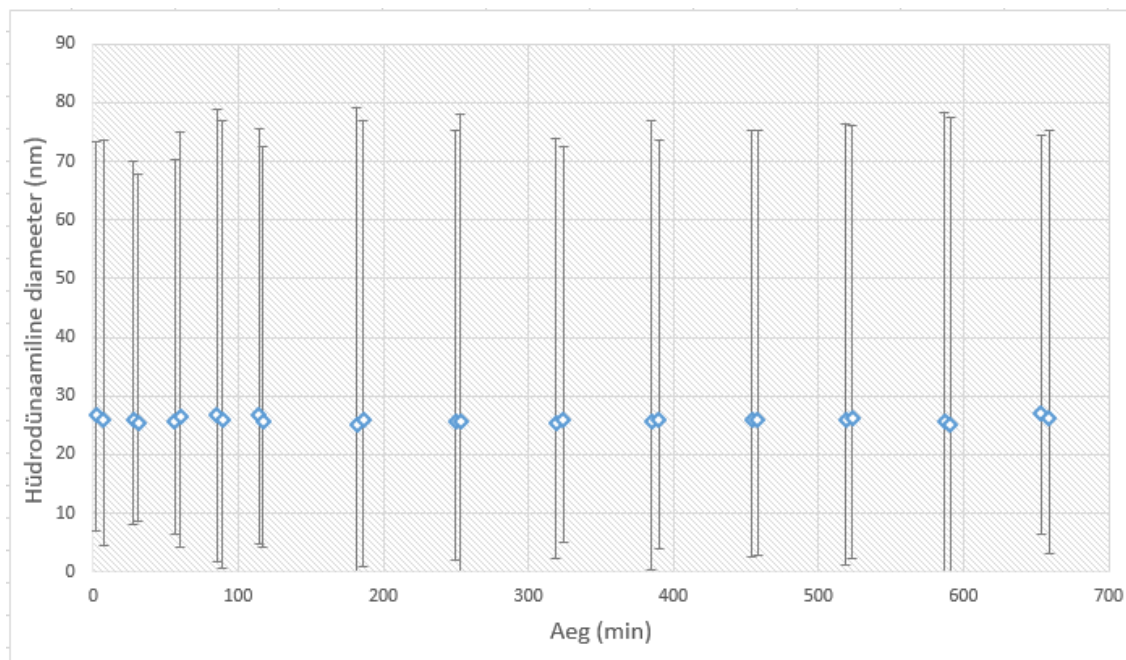
Isopropanoolis disperseerunud kaassadestamise meetodil loodud osakeste hüdrodünaamilise läbimõõdu keskväärtuseks mõõdeti 1281 nm, standardhälbega 270 nm. Osakeste suur diameeter on tingitud nende aglomeerumisest, millele viitas ka silmaga nähtav osakeste gravitatsiooniline sadenemine. Osakeste dispersiooni ebastabiilsuse tõttu ei parandanud mõõtetulemust ka nende eelnev sonikeerimine. Lisaks mõõdeti samade osakeste suurusjaotus disperseerituna destilleeritud vees (lisa 12), kus osakeste mõõtmed jäid nanoskaalasse - diameetri keskväärtuseks saadi 132.1 nm, standardhälbega 83.1 nm. Siiski on antud osakesed laia suurusjaotusega ning agregeerunud. Kahes erinevas lahuses paiknevate agregaatide mõõtmete erinevustest võib arvata, et hüdrofoobsem lahusti põhjustab hüdrofiilse katendiga osakeste agregaatide suurenemise. Samuti ei olnud stabiilsed kaassadestamise meetodil saadud osakesed, millel oli silaankate ning mis olid disperseeritud destilleeritud vette. Antud osakeste mõõtmine footonkorrelatsioonspektromeetriga oli komplitseeritud, sest osakesed sadenesid silmnähtavalt küveti põhja. Graafikult on näha, et antud osakestel tekib kaks eraldi jaotust, millest suurem on mikroskaalas. Esimese jaotuse keskväärtus on 369 nm, standardhälbega 68 nm ning teise jaotuse keskväärtuseks mõõdeti 1718 nm, standardhälbega 546 nm. Tegu on tugevalt agregeerunud ning laia suurusjaotusega osakestega, mis ei ole piisavalt stabiilselt, et võimaldada nende kasutamine erinevates biotehnoloogilistes rakendustes.

Termolüüsi meetodil sünteesitud osakeste suurusjaotus mõõdeti disperseerituna heksaanis. Nende diameetrite keskväärtuseks saadi 11.7 nm, standardhälbega 4.8 nm. Võrreldes antud mõõtmeid TEM-iga saadud arvväärtustega ning arvestades, et TEM võimaldas meil mõõta vaid nanoosakese tuuma mõõteid, võib väita, et tulemused on omavahel heas vastavuses. Antud osakesed säilitasid dispersiooni stabiilsuse ka pärast funktsionaliseerimist – silaankattega nanoosakeste diameetri keskväärtuseks footonkorrelatsioonspektromeetriga mõõdeti 68.1 nm, standardhälbega 22.6 nm.



Joonis 6. DLS meetodil mõõdetud suurusjaotused. Esitatud on kaassadestamise meetodil sünteesitud ilma katteta osakeste jaotus (a) ning silaankattega osakeste jaotus (b). Samuti termolüüsi meetodil sünteesitud osakeste katteta (c) ning silaankattega (d) mõõtetulemused.

Termolüüsi meetodil sünteesitud silaankatteta osakeste stabiilsuse kinnitamiseks viidi läbi katse, kus 12 h perioodi vältel mõõdeti proovi suurusjaotust 26 korda. Mõõdetud suuruste keskväärtused koos suurusvahemikuga, millesse mahub 95% osakestest, on esitatud aegreana joonisel 7.



Joonis 7. Termolüüsi meetodil sünteesitud nanoosakeste suuruse keskvärtuse muutumine ajas koos vahemikuga, millesse mahub 95% osakekestest.

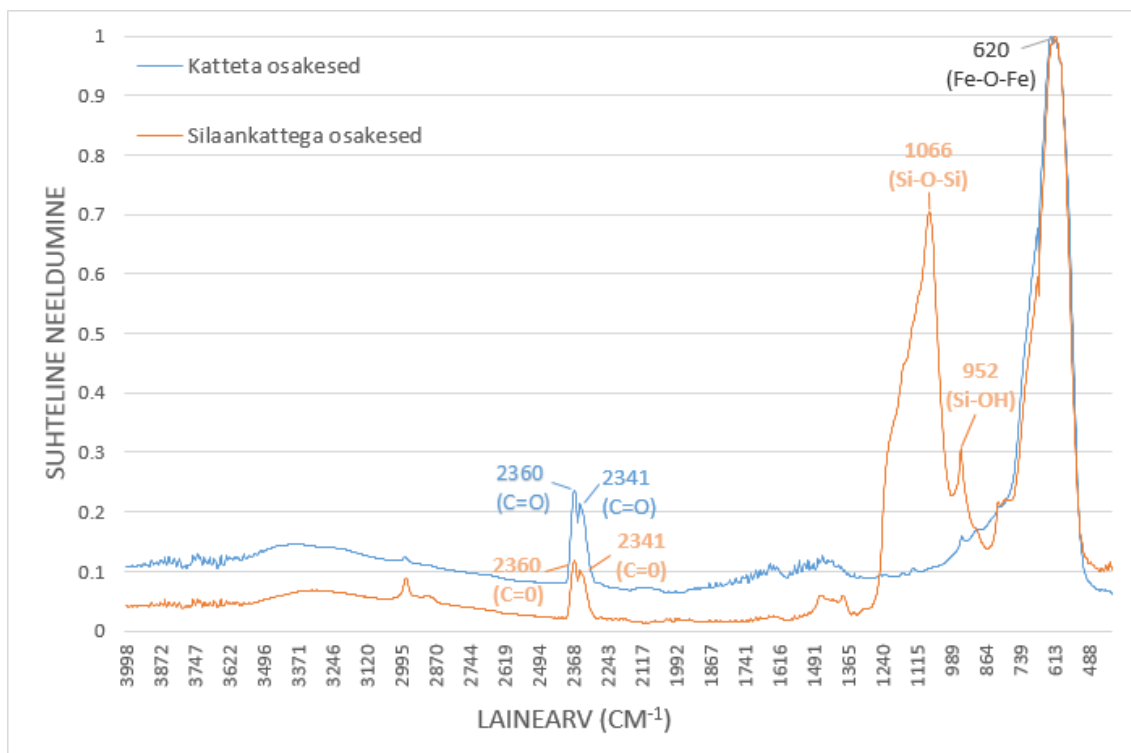
Antud graafikult on näha, et osakeste hüdrodünaamilise diameetri keskvärtus ning ka suurusjaotus muutus oli antud perioodi vältel väike. Nimetatud diameetri keskvärtus jäi vahemikku 25.0 nm kuni 27.0 nm ning suurusvahemiku ulatus, kuhu mahtus 95% mõõdetud osakekestest, oli 33.6 nm kuni 58.4 nm. Samuti ei täheldatud antud proovis silmnähtavat sadenemist kuue kuu jooksul. Antud tulemused annavad põhjust eeldada, et loodud nanoosakesed on piisavalt stabiilsed, et võimaldada nende edasine kasutamine valitud rakendustes.

4.3. Infrapunaspetskoopia

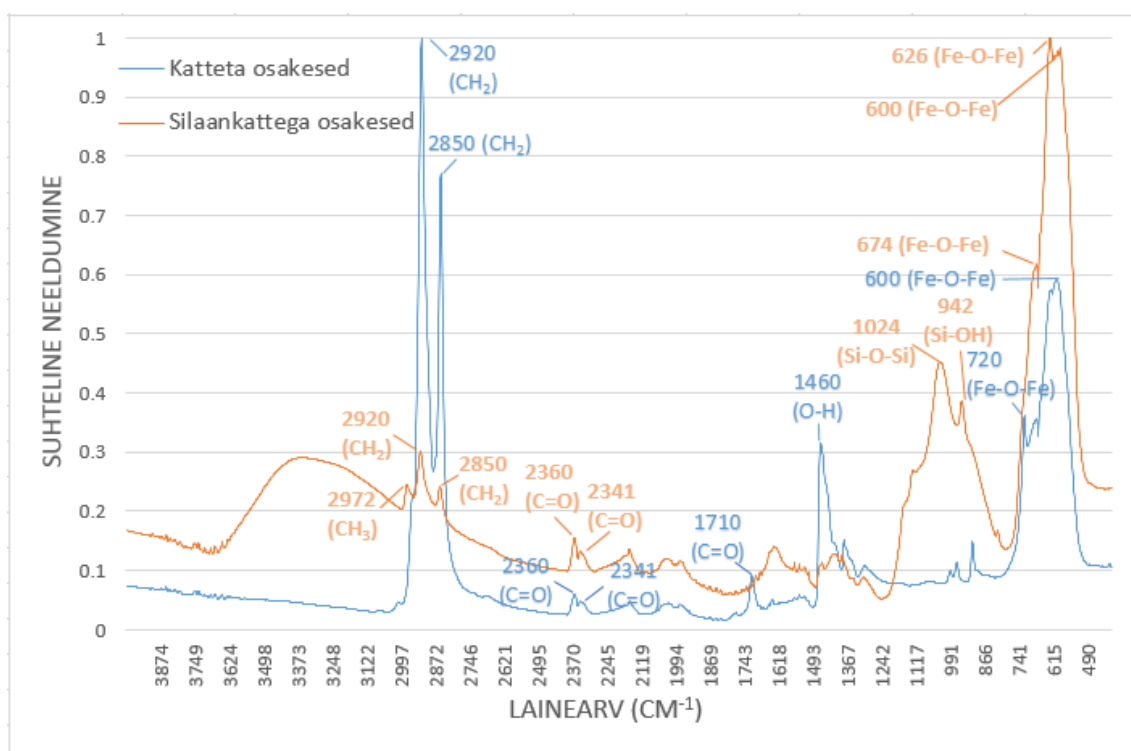
Loodud osakeste keemilise koostise kindlaks tegemiseks mõõdetud infrapunaspetsktrid on toodud joonistel 8 ning 9.

Kaassadestamise meetodil sünteesitud nanoosakeste infrapunaspetsktritel avalduvad tugevalt hapnik-raud-hapnik sidemete paindumisele vastavad neeldumisjooned (620 cm^{-1}). Tegemist on tähtsa tulemusega, sest kinnitab teadmist, et loodud osakesed on raudoksiidsed. Silaanitud nanoosakeste spektril eristuvad selgelt räni-hapnik sidemete antisümmeetrilise ning räni-hüdrosüül sidemete sümmeetrilise paindumise põhjustatud tipud (vasatavalt 1066 cm^{-1} ning 952 cm^{-1}). Seega oli raudoksiidsete nanoosakeste funktsionaliseerimine edukas, sest nad kattusid soovitud silaankihiga. Samuti on täheldatavad süsinik-hapnik kaksiksideme erinevatele võnkumistele vastavad tipud lainearvudel 2360 cm^{-1} ning 2341 cm^{-1} . Tõenäoliselt on antud väärtused tekkinud taustspektri puuduliku mahalahutamise tulemusena.

Intensiivsed tipud vahemikus 600 cm^{-1} kuni 720 cm^{-1} kinnitavad raudoksiidsete nanoosakeste olemasolu ka termolüüsi meetodil sünteesitud osakestel, sest vastavad Fe-O-Fe sidemete erinevatele võnkumistele. Funktsionaliseerimata osakeste puhul on täheldatavad tipud lainearvude väärtustel 2920 cm^{-1} ning 2850 cm^{-1} , mis on põhjustatud vastavalt CH_2 sidemete asümmeetrilisest ning sümmeetrilisest paindumisest. Antud tipud on märgatavad ka silaanitud osakeste puhul, kuid palju nõrgema intensiivsusega. Neeldumised antud väärtustel on põhjustatud oleiinhapest, mis moodustas sünteesiprotsessil nanoosakeste pinnale hüdrofoobse pinnakihi. Samuti on väärtusel 1460 cm^{-1} põhjustanud neeldumise oleiinhappes painduv O-H side. Lisaks esinevad funktsionaliseeritud osakeste puhul Si-O-Si ning Si-OH sidemete põhjustatud tipud lainearvu väärtustel 1024 cm^{-1} ning 942 cm^{-1} , mis kinnitavad, et funktsionaliseerimise käigus õnnestus katta nanoosakesi silaani kihiga. Antud silaankatte lisamine nõrgendas CH_2 ning O-H neeldumisele vastavate tippude intensiivsust, mis omakorda tõestab pinnakihi muutumist. Ka termolüüsi meetodil sünteesitud osakeste infrapunaspetsktris on täheldatavad süsinik-hapnik kaksiksidemete neeldumist, mis on põhjustatud taustspektri poolt. Kuid antud juhul esineb süsinik-hapnik kaksideme võnkumisele vastav tipp ka lainearvu väärtusel 1710 cm^{-1} . Antud neeldumine on põhjustatud vaba oleiinhappe poolt, mis näitab, et materjalis paikneb osaliselt oleiinhapet, mis ei ole ennast raudoksiidsete nanoosakese pinnale sidunud.



Joonis 8. Kaassadestamise meetodil sünteesitud nanoosakeste infrapunaspekter.



Joonis 9. Termolüüsi meetodil sünteesitud nanoosakeste infrapunaspekter.

5. Kokkuvõte ja järeldused

5.1. Kokkuvõte

Käesolev bakalaureusetöö on esimeseks etapiks mahukamale projektile, mille eesmärgiks on töötada välja superparamagnetiliste nanoosakeste valmistamise ja iseloomustamise meetodikad, mis oleksid kasutatavad spetsiifilise biotehnoloogilise funktsionaalsuse saavutamisele orienteeritud arendustöös. Seetõttu esitati antud töös laialdasem kirjanduslik ülevaade raudoksiidsete nanoosakeste omadustest ning sünteesimeetoditest. Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli arendustöö esimeste etappide realiseerimine: raudoksiidsete nanoosakeste süntees, funktsionaliseerimine ning loodud osakeste füüsikaline ja keemiline iseloomustamine.

Töö eesmärk täideti planeeritud mahus. Kirjandusele toetudes otsustati sünteesimiseks rakendada termolüüsi ja kaassadestamise meetodeid ning funktsionaliseerimiseks katta saadud osakesi silaankihiga. Loodud osakeste füüsikaliseks iseloomustamiseks kasutati SEM-i, TEM-i ja DLS-i ning keemilise koostise kindlaksmääramiseks ATR-FTIR-i.

5.2. Järeldused

Töös näidati, et mõlema kasutatud sünteesimeetodiga on võimalik sünteesida sfäärilisi raudoksiidseid nanoosakesi ning vastavate protokollide põhjal neid silaneerida. Termolüüsi meetodil sünteesitud nanoosakesed olid väiksema diameetriga ning kitsama suurusjaotusega kui kaassadestamise meetodil sünteesitud osakesed, mille puhul täheldati osakeste tugevat agregeerimist. Saadud tulemused näitavad, et termolüüsi meetodil loodud osakesed on dispersses süsteemis stabiilsemad. Analooget tulemust täheldati ka silaankattega nanoosakeste võrdluses, kus termolüüsi meetodil sünteesitud osakesed olid mõõtmetelt väiksemad ning monodisperssemad.

Tulemustest järeldati, et termolüüsi meetodil sünteesitud nanoosakeste füüsikalised omadused on biotehnoloogilisteks rakendusteks sobivamad, kuid antud meetodi puuduseks on kõrgetel temperatuuridel toimuv keerulisem sünteesimeetod. Kaassadestamise meetodil loodud osakeste ebastabiilsus tingis nende agregeerumise, mistõttu ei ole võimalik nende aplitseerimine monodisperssust eeldatavates rakendustes. Nende kasutamise võimaldamiseks biotehnoloogilistes rakendustes on tarvilik leida viis dispersioonide muutmiseks monodispersseks enne funktsionaliseerimise läbiviimist. Seevastu oli nende magnetiline kokku kogumine oluliselt lihtsam, mis loob eelise kasutamiseks keemiatööstuses. Töö käigus saadud tulemused kinnitasid püstitatud hüpoteesi, et termolüüsi meetodil sünteesitud osakesed on väiksemate mõõtmetega ning kitsama suurusjaotusega.

Järgnevalt on projekti eesmärgiks kasutatud sünteesimeetodeid edasi arendada, tuginedes selleks antud tööst saadud tulemustele. Plaanis on välja töötada protokolle, mille põhjal oleks võimalik sünteesida monodispersseid funktsionaliseeritud raudoksiidseid nanoosakesi, mis on loodud spetsiifilise kasutusala jaoks. Töö autori edasiseseks ülesandeks käesoleva projekti raames on sünteesitavate nanoosakeste kristallilisuse, magnetiliste omaduste ning kontrollitud aglomeerumise teaduslik uurimine. Lõppeesmärgiks on seatud nende otsene kasutus biotehnoloogilistes rakendustes.

6. Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Holger Saare

Summary

In this study physical properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles were investigated. These are nanosized particles, which hold immense potential in a vast variety of industrial and biomedical applications since they exhibit unique magnetic properties, which differ from the corresponding bulk materials.

The purpose of this thesis was to synthesize superparamagnetic iron oxide nanoparticles by thermal decomposition and co-precipitation methods and to functionalize and characterize the nanoparticles. It was hypothesized that the thermal decomposition method yields nanoparticles with smaller diameters and more narrow size distribution. For physical characterization, SEM, TEM and DLS were used and for chemical analysis, ATR-FTIR was chosen. To functionalize the particles they were coated with silica, which increases their stability in suspensions and allows to attach different biomolecules to the surface, which allows to implement the particle in different biotechnological applications.

The measurements confirmed the hypothesis. The nanoparticles synthesized by thermal decomposition were more monodisperse and smaller in size compared to the particles created by co-precipitation method. The same statement held true for the functionalized particles. From this was concluded that iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition method are more applicable for biotechnological applications where the monodispersity of the particles is critical.

7. Tänuavaldused

Käesoleva töö valmimise eest soovin eelkõige tänada enda juhendajaid Martin Järvekülge ning Rainis Ventat, kes tutvustasid mulle teaduse tagamaid ning jagasid toetavaid nõuandeid ja konstruktiivset tagasisidet. Aitäh, et olite mulle kui mentorid. Samuti tänan Uno Mäeorgu infrapunasppektrite mõõtmise abistamise eest, Rando Saart SEM-i piltide eest, Urmast Joosti iseloomustamismeetodite alaste konsultatsioonide eest, TEM-i pildid teinud Toomas Jagomäge ning Meeri Visnapuud, kes õpetas mulle footonkorrelatsioonspektroskoobi mõõtmismetoodikat ning jagas näpunäiteid TEM-i proovide ettevalmistamisel.

Kasutatud kirjandus

- [1] J. L. Kirschvink, A. Kobayashi-Kirschvink ja B. J. Woodford, „Magnetite biomineralization in the human brain,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, kd. 89, nr 16, 1992.
- [2] Z. Wang, X. Hu, P.-O. Käll ja H. Ulf, „High Li⁺-Ion Storage Capacity and Double-Electrochromic Behavior of Sol–Gel-Derived Iron Oxide Thin Films with Sulfate Residues,“ *Chemistry of Materials*, kd. 13, nr 6, 2001.
- [3] S. P. Gubin, *Magnetic Nanoparticles*, Wiley-VCH, 2009.
- [4] R. M. Cornell ja U. Schwertmann, *The Iron Oxides Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [5] A. Navrotsky, L. Mazeina ja J. Majzlan, „Size-driven structural and thermodynamic complexity in iron oxides,“ *Science*, kd. 319, nr 5870, 2008.
- [6] O. Petravic, „Superparamagnetic nanoparticle ensembles,“ *Superlattices and Microstructures*, kd. 47, nr 5, 2010.
- [7] S. Bedanta ja W. Kleemann, „Supermagnetism,“ *Journal of Physics D: Applied Physics*, kd. 42, nr 1, 2009.
- [8] N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng ja S. Sun, „Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage,“ *Chemical Society Reviews*, kd. 38, nr 9, 2009.
- [9] K. Sato, S. Yokosuka, Y. Takimagi, K. Hirakuri, K. Fujioka, Y. Manome, H. Sukegawa, H. Iwai ja N. Fukata, „Size-Tunable Silicon/Iron Oxide Hybrid Nanoparticles with Fluorescence, Superparamagnetism, and Biocompatibility,“ *Journal of the American Chemical Society*, kd. 133, nr 46, 2011.
- [10] X.-H. Li, C.-L. Xu, X.-H. Han, L. Qiao, T. Wang ja F.-S. Li, „Synthesis and Magnetic Properties of Nearly Monodisperse CoFe₂O₄ Nanoparticles Through a Simple Hydrothermal Condition,“ *Nanoscale Research Letters*, kd. 5, nr 6, 2010.
- [11] O. Mihaela, „Study about the possibility to control the superparamagnetism–superferromagnetism transition in magnetic nanoparticle systems,“ *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, kd. 343, nr 5, 2013.
- [12] A. S. Teja ja P.-Y. Koh, „Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles,“ *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, kd. 55, nr 1-2, 2009.
- [13] U. Meisen ja H. Kathrein, „The influence of Particle Size, Shape and Particle Size Distribution on Properties of Magnetites for the Production of Toners,“ *Journal of Imaging Science and Technology*, kd. 44, nr 6, 2000.

- [14] R. A. Ali-zade, „Size Distribution Function of Magnetite Nanoparticles in Disperse Systems,“ *Inorganic Materials*, kd. 44, nr 10, 2008.
- [15] Y. Qiang, J. Antony, A. Sharma, J. Nutting, D. Sikes ja D. Meyer, „Iron/iron oxide core-shell nanoclusters for biomedical applications,“ *Journal of Nanoparticle Research*, kd. 8, nr 3-4, 2006.
- [16] Wahajuddin ja S. Arora, „Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers,“ *International Journal of Nanomedicine*, kd. 7, nr 6, 2012.
- [17] R. L. Edelstein, C. R. Tamanaha, P. E. Sheehan, M. M. Miller, D. R. Baselt, L. J. Whitman ja R. J. Colton, „The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents,“ *Biosensors & Bioelectronics*, kd. 14, nr 10-11, 2000.
- [18] D. Barcelo ja M. Farré, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume 59, Elsevier, 2012.
- [19] M. Mahmoudi, A. Simchi, A. S. Milani ja P. Stroeve, „Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles,“ *Journal of Colloid and Interface Science*, kd. 336, nr 2, 2009.
- [20] C. C. Berry, S. Wells, S. Charles ja A. S. G. Curtis, „Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro,“ *Biomaterials*, kd. 24, nr 25, 2003.
- [21] H. L. Karlsson, L. Möller, P. Cronholm ja J. Gustafsson, „Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison,“ *Chemical research in toxicology*, kd. 21, nr 9, 2008.
- [22] B. Ankamwar, T. C. Lai, J. H. Huang, R. S. Liu, M. Hsiao, C. H. Chen ja Y. K. Hwu, „Biocompatibility of Fe(3)O(4) nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells,“ *Nanotechnology*, kd. 21, nr 7, 2010.
- [23] Y. Anzai, C. W. Piccoli, E. K. Outwater, W. Stanford, D. A. Bluemke, P. Nurenberg, S. Saini, K. R. Maravilla, D. E. Feldman, U. P. Schmiedl, J. A. Brunberg, I. R. Fancis, S. E. Harms, P. M. Som ja C. M. Tempancy, „Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study,“ *Radiology*, kd. 228, nr 3, 2003.
- [24] F. D. Birkhäuser, U. E. Studer, J. M. Froehlich, M. Triantafyllou, L. J. Bains, G. Petraila, P. Vermathen, A. Fleischmann ja H. C. Thoeny, „Combined ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced and diffusion-weighted magnetic resonance imaging facilitates detection of metastases in normal-sized pelvic lymph nodes of patients with bladder and prostate cancer,“ *European Urology*, kd. 64, nr 6, 2013.

- [25] N. Singh, G. J. Jenkins, R. Asadi ja S. H. Doak, „Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION),“ *Nano Reviews*, kd. 1, nr 10, 2010.
- [26] P. Gould, „Nanomagnetism shows in vivo potential,“ *NanoToday*, kd. 1, nr 4, 2006.
- [27] A. K. Gupta ja M. Gupta, „Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications,“ *Biomaterials*, kd. 26, nr 18, 2005.
- [28] J. Park, K. An, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. No, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang ja T. Hyeon, „Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals,“ *Nature Materials*, kd. 3, 2004.
- [29] R. Qiao, C. Yang ja M. Gao, „Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications,“ *Journal of Materials Chemistry*, kd. 19, nr 35, 2009.
- [30] W. Yu, J. Falkner, C. Yavuz ja V. Colvin, „Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts,“ *Chemical Communications*, nr 20, 2004.
- [31] P. Alivisatos, E. Scher ja J. Rockenberger, „A New Nonhydrolytic Single-Precursor Approach to Surfactant-Capped Nanocrystals of Transition Metal Oxides,“ *Journal of the American Chemical Society*, nr 121, 1999.
- [32] M. Mahmoudi, S. Sant, W. Ben, L. Sophie ja T. Sen, „Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, kd. 63, 2011.
- [33] L. A. Welo ja O. Baudisch, „CERTAIN OXIDES OF IRON IN SOME NEW CATALYTIC ACTIONS,“ *Science*, kd. 62, nr 1925, 1925.
- [34] D. K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K. V. Rao ja M. Muhammed, „Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles,“ *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, kd. 225, nr 1-2, 2001.
- [35] G. Gnanaprakash, S. Mahadevan, T. Jayakumar, P. Kalyanasundaram, J. Philip ja B. Raj, „Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles,“ *Materials Chemistry and Physics*, kd. 103, nr 1, 2007.
- [36] B. Paul ja S. Moulik, „Uses and applications of microemulsions,“ *Current Science*, kd. 80, nr 8, 2001.
- [37] A. K. Gupta, „Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies,“ *IEEE Transactions on NanoBioscience*, kd. 3, nr 1, 2004.
- [38] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan ja M. A. El-Sayed, „Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes,“ *Chemical Reviews*, kd. 105, nr 4, 2005.

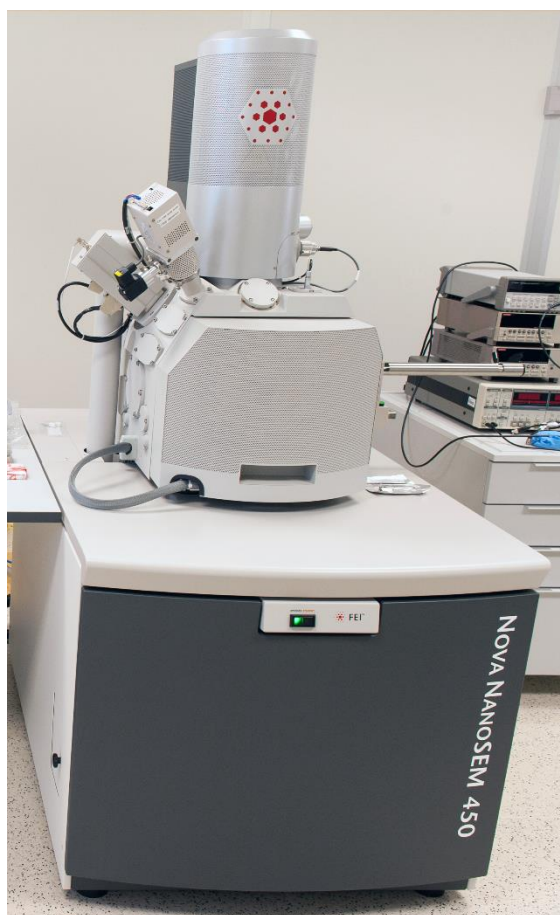
- [39] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst ja R. N. Muller, „Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications,“ *Chemical Reviews*, kd. 8, nr 108, 2008.
- [40] J. Wang, J. Sun, Q. Sun ja Q. Chen, „One-step hydrothermal process to prepare highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles with improved magnetic properties,“ *Materials Research Bulletin*, kd. 38, nr 7, 2003.
- [41] Y.-H. Zheng, Y. Cheng, F. Bao ja Y.-S. Wang, „Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles,“ *Materials Research Bulletin*, kd. 41, nr 3, 2006.
- [42] F. del Monte, M. P. Morales, D. Levy, A. Fernandez, M. Ocaña, A. Roig, E. Molins, K. O'Grady ja C. J. Serna, „Formation of γ -Fe₂O₃ Isolated Nanoparticles in a Silica Matrix,“ *Langmuir*, kd. 13, nr 14, 1997.
- [43] C. Cannas, D. Gatteschi, A. Musinu, G. Piccaluga ja C. Sangregorio, „Structural and Magnetic Properties of Fe₂O₃ Nanoparticles Dispersed over a Silica Matrix,“ *The Journal of Physical Chemistry B*, kd. 102, nr 40, 1998.
- [44] G. Ennas, A. Musinu, G. Piccaluga, D. Zedda, D. Gatteschi, C. Sangregorio, J. L. Stanger, G. Concas ja G. Spano, „Characterization of Iron Oxide Nanoparticles in an Fe₂O₃–SiO₂ Composite Prepared by a Sol–Gel Method,“ *Chemistry of Materials*, kd. 10, nr 2, 1998.
- [45] K. S. Suslick, S.-B. Choe, A. A. Cichowlas ja M. W. Grinstaff, „Sonochemical synthesis of amorphous iron,“ *Nature*, kd. 353, 1991.
- [46] R. Vijayakumar, Y. Koltypin, I. Felner ja A. Gedanken, „Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles,“ *Materials Science and Engineering: A*, kd. 286, nr 1.
- [47] H. Gupta, P. Paul, N. Kumar, S. Baxi ja D. P. Das, „One pot synthesis of water-dispersible dehydroascorbic acid coated Fe₃O₄ nanoparticles under atmospheric air: Blood cell compatibility and enhanced magnetic resonance imaging,“ *Journal of Colloid and Interface Science*, kd. 430, nr 15, 2014.
- [48] K. Raj ja R. Moskowitz, „Commercial applications of ferrofluids,“ *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, kd. 85, nr 1-3, 1990.
- [49] K. Raj, B. Moskowitz ja S. Tsuda, „New commercial trends of nanostructured ferrofluids,“ *Indian Journal of Engineering and Materials Sciences*, kd. 11, nr 4, 2003.
- [50] A.-H. Lu, E. L. Salabas ja F. Schüth, „Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application,“ *Angewandte Chemie*, kd. 46, nr 8, 2007.

- [51] M. H. Sousa, A. F. Tourinho, J. Depeyrot, G. J. da Silva ja M. C. F. L. Lara, „New Electric Double-Layered Magnetic Fluids Based on Copper, Nickel, and Zinc Ferrite Nanostructures,“ *The Journal of Physical Chemistry B*, kd. 105, nr 6, 2001.
- [52] D. Farrell, S. A. Majetich ja J. P. Wilcoxon, „Preparation and Characterization of Monodisperse Fe Nanoparticles,“ *The Journal of Physical Chemistry B*, kd. 107, nr 40, 2003.
- [53] Y. Sun, L. Duan, Z. Guo, Y. DuanMu, M. Ma, L. Xu, Y. Zhang ja N. Gu, „An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application,“ *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, kd. 285, nr 1-2, 2005.
- [54] P. Mulvaney, L. M. Liz-Marzan, T. Ung ja M. Giersig, „Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters,“ *Journal of Material Chemistry*, kd. 10, nr 6, 2000.
- [55] C.-W. Lu, Y. Hung, J.-K. Hsia, M. Yao, T.-H. Chung, Y.-S. Lin, S.-H. Wu, H.-M. Liu, C.-Y. Mou, D.-M. Huang ja Y.-C. Chen, „Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling,“ *Nano Letters*, kd. 7, nr 1, 2007.
- [56] National Center for Biotechnology Information, Molecular Imaging and Contrast Agent Database, Bethesda, 2013.
- [57] V. L. Colvin, A. N. Goldstein ja A. P. Alivisatos, „Semiconductor nanocrystals covalently bound to metal surfaces with self-assembled monolayers,“ *Journal of the American Chemical Society*, kd. 114, nr 13, 1992.
- [58] A. G. Mailer, P. S. Clegg ja P. N. Pusey, „Particle sizing by dynamic light scattering: non-linear cumulant analysis,“ *Journal of Physics: Condensed matter*, kd. 27, nr 14, 2015.
- [59] A. Bjørnerud ja L. Johansson, „The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and applications in the cardiovascular system,“ *NMR in Biomedicine*, kd. 17, nr 7, 2004.
- [60] „Surface Functionalization of Single Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Magnetic Resonance Imaging,“ *Small*, kd. 5, nr 11, 2009.
- [61] J. Meng, J. Fan, G. Galiana, R. T. Branca, P. L. Clasen, S. Ma, J. Zhou, J. Leuschner, C. Kumar, J. Hormes, A. Beye, C. J. Kiely, W. Warren, M. P. Haataja ja W. O. Soboyejo, „LHRH-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for breast cancer targeting and contrast enhancement in MRI,“ *Materials Science and Engineering: C*, kd. 29, nr 5, 2009.
- [62] Y. Wang, S. Hussain ja G. Krestin, „Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging,“ *European Radiology*, kd. 11, nr 11, 2001.

- [63] M. G. Harishinghani, J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, C. H. van de Kaa, J. de la Rosette ja R. Weissleder, „Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer,“ *The New England Journal of Medicine*, kd. 349, nr 10, 2003.
- [64] J. H. Lee, Y. M. Huh, Y. W. Jun, J. W. Seo, J. T. Jang, H. T. Song, S. Kim, E. J. Cho, H. G. Yoon, J. S. Suh ja J. Cheon, „Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging,“ *Nature Medicine*, kd. 13, nr 1, 2006.
- [65] P. Cherukeri, E. S. Glazer ja S. A. Curley, „Targeted hyperthermia using metal nanoparticles,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, kd. 62, nr 3, 2010.
- [66] P. K. Sneed, P. R. Stauffer, M. W. McDermoot, C. J. Diederich, K. R. Lamborn, M. D. Prados, S. Chang, K. A. Weaver, M. K. Malec, S. A. Lamb, W. M. Wara, D. A. Larson, T. L. Phillips ja P. H. Gutin, „Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost +/- hyperthermia for glioblastoma multiforme.,“ *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, kd. 40, nr 2, 1998.
- [67] R. E. Rosensweig, „Heating magnetic fluid with alternating magnetic field,“ *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, kd. 252, 2002.
- [68] M. M. Yallapu, S. F. Othman, E. T. Curtis, B. K. Gupta, M. Jaggi ja S. C. Chauhan, „Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy,“ *Biomaterials*, kd. 32, nr 7, 2011.
- [69] C. Boyer, M. R. Whittaker, V. Bulmus, J. Liu ja T. P. Davis, „The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications,“ *NPG Asia Materials*, kd. 1, nr 2, 2010.
- [70] R. Meijas, S. Perez-Yague, L. Gutierrez, L. I. Cabrera, R. Spada, P. Aceda, C. J. Serna, F. J. Lazaro, A. Villanueva ja M. D. Morales, „Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy,“ *Biomaterials*, kd. 32, nr 11, 2011.
- [71] A. S. Lübke, C. Bergemann, J. Brock ja D. G. McClure, „Physiological aspects in magnetic drug-targeting,“ *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, kd. 194, nr 1-3, 1999.
- [72] A. S. Lübke, C. Bergemann, H. Riess, P. Reichardt, K. Possinger, B. Dörken, F. Herrmann, R. Gürtler, P. Hohenberger, N. Haas, R. Sohr, B. Sander, A. J. Lemke, D. Ohlendorf, W. Huhnt ja D. Huhn, „Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors.,“ *Cancer Research*, kd. 56, nr 20, 1996.
- [73] R. A. Sheldon, „Why green chemistry and sustainability of resources are essential to our future,“ *Journal of Environmental Monitoring*, kd. 4, nr 10, 2008.

- [74] P. Li, D. E. Miser, S. Rabiei, R. T. Yadav ja R. H. Mohammad, „The removal of carbon monoxide by iron oxide nanoparticles,” *Applied Catalysis B: Environmental*, kd. 43, nr 2, 2003.
- [75] M. A. Uddin, H. Tsuda, S. Wu ja E. Sasaoka, „Catalytic decomposition of biomass tars with iron oxide catalysts,” *Fuel*, kd. 87, nr 4-5, 2008.
- [76] F. Shi, M. K. Tse, S. Zhou, M.-M. Pohl, J. Radnik, S. Hübner, M. Beller ja K. Jähnisch, „Green and Efficient Synthesis of Sulfonamides Catalyzed by Nano-Ru/Fe₃O₄,” *Journal of the American Chemical Society*, kd. 131, nr 5, 2009.
- [77] J. Y. Ying, D. K. Yi ja S. S. Lee, „Synthesis and applications of magnetic nanocomposite catalysts,” *Chemistry of Materials*, kd. 18, nr 10, 2006.
- [78] Finnish Quality Association, „The Quality Innovation of the Year Competition,” [Võrgumaterjal]. <http://www.qualityinnovation.org/our-story/>. [Kasutatud 23 mai 2015].
- [79] K. Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse, F. E. Ghissassi, N. Guha, L. Tallaa-Benbrahim, C. Scoccianti, H. Mattock ja K. Straif, „Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate,” *The Lancet Oncology*, kd. 16, nr 5, 2005.
- [80] C. P. Monaghan ja J. C. Fanning, „Dissolving iron nails: A kinetics experiment,” *Journal of Chemical Education*, kd. 55, nr 6, 1978.
- [81] F. Moghaddam ja S. Ayati, „Copper immobilized onto the triazole functionalized magnetic nanoparticle: a robust magnetically recoverable catalyst for "click" reaction,” *RSC Advances*, nr 5, 2015.
- [82] C. Okoli, M. Sanchez-Dominguez, M. Boutonnet, S. Järås, C. Civera, C. Solans ja G. R. Kuttuva, „Comparison and functionalization study of microemulsion-prepared magnetic iron oxide nanoparticles,” *Langmuir*, kd. 28, nr 22, 2012.
- [83] FEI Company, „Tecnai G2 Spirit for Life Sciences,” [Võrgumaterjal]. <http://www.fei.com/products/tem/tecnai-g2-spirit-for-life-sciences/>. [Kasutatud 25 mai 2015].

Lisad



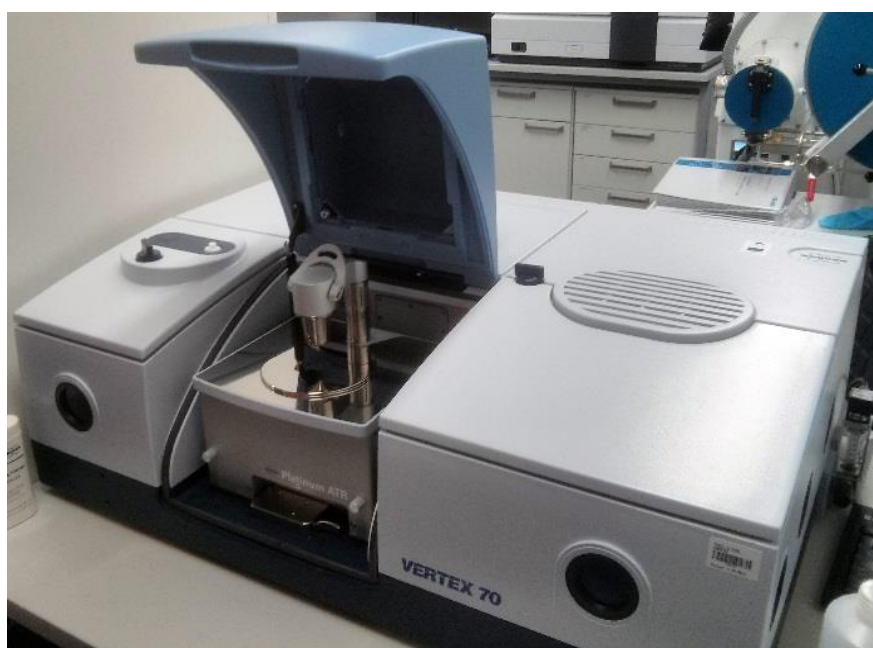
Lisa 1. Skaneeriv elektronmikroskoop FEI Nova NanoSem 450. Foto autor Rando Saar.



Lisa 2. Transmissioonelektronmikroskoop FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin [83].



Lisa 3. Footonkorrelatsioonspektromeeter Malvern Zetasizer Nano ZSP.



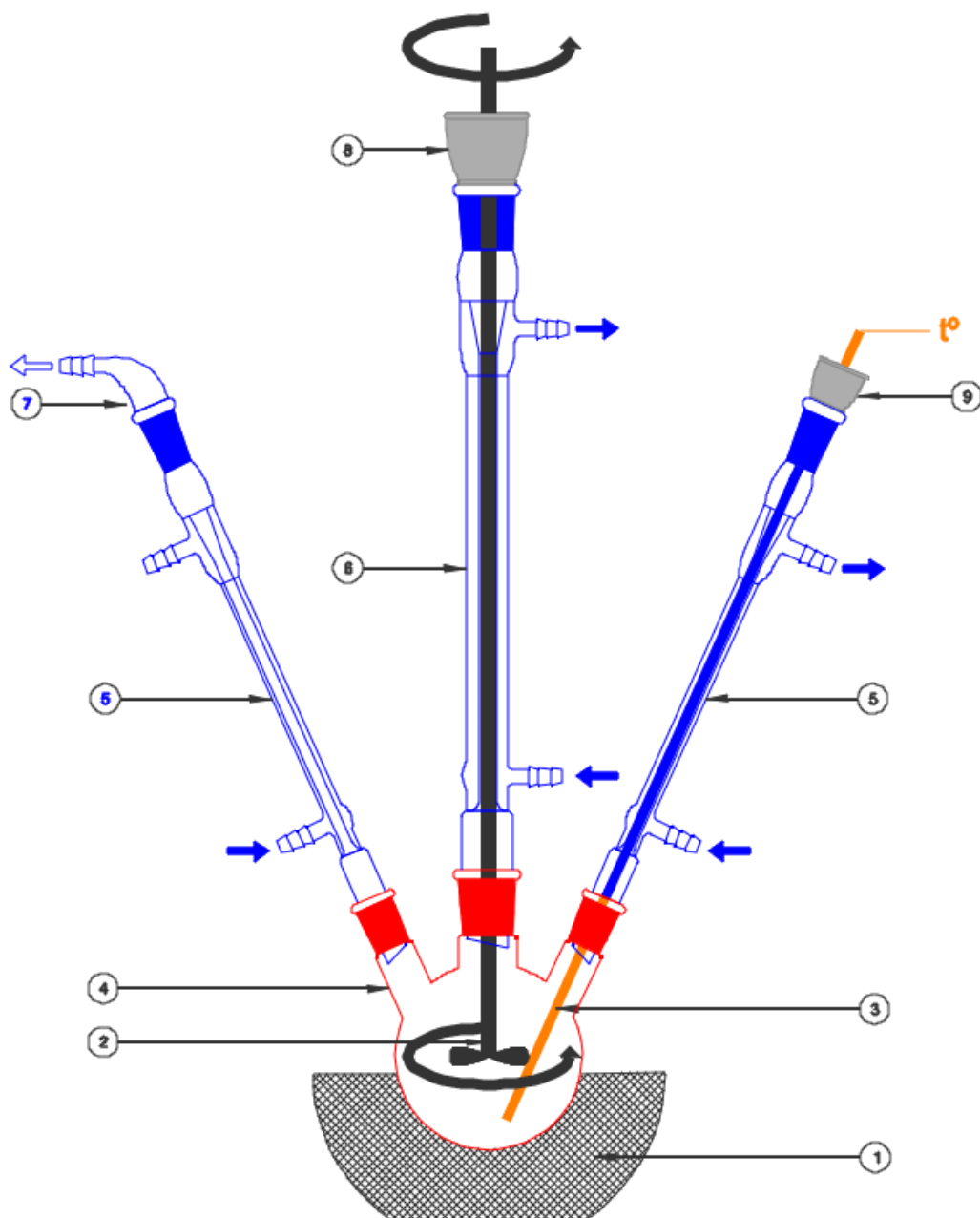
Lisa 4. Infrapunaspetsktromeeter Platinum Vertex 70 ning Platinum ATR lisaseade.



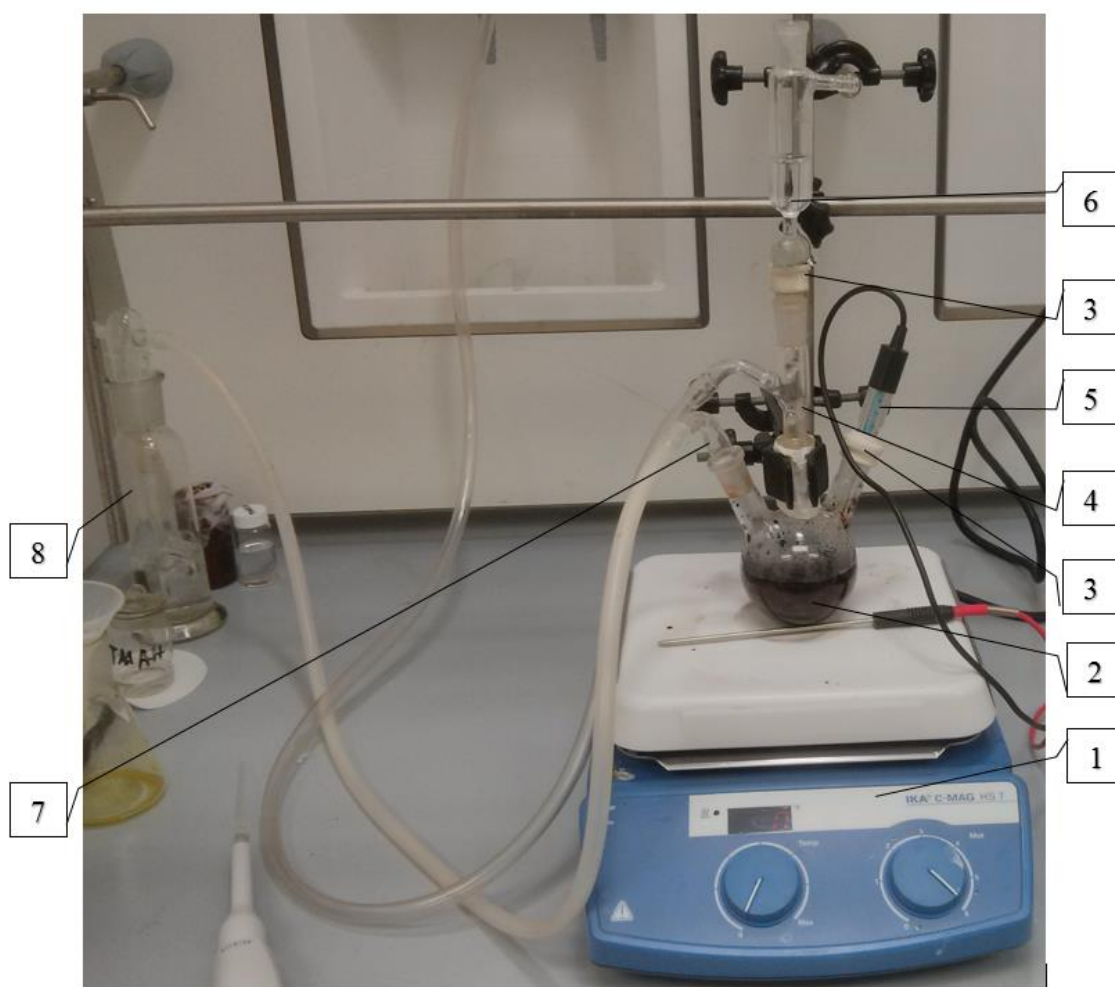
Lisa 5. Ultrahelivann Bandelin Sonorex Digital 10 P.



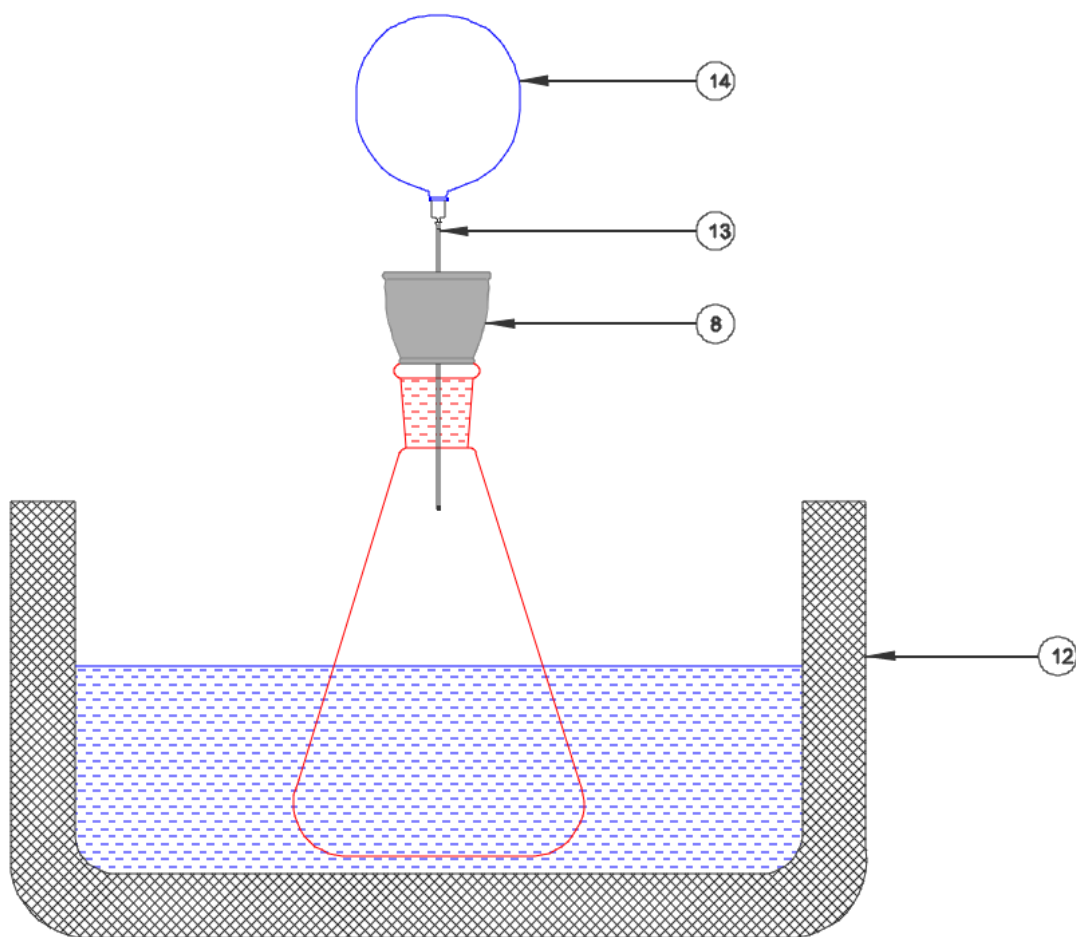
Lisa 6. Tsentrifuug Heraeus Multifuge X1R.



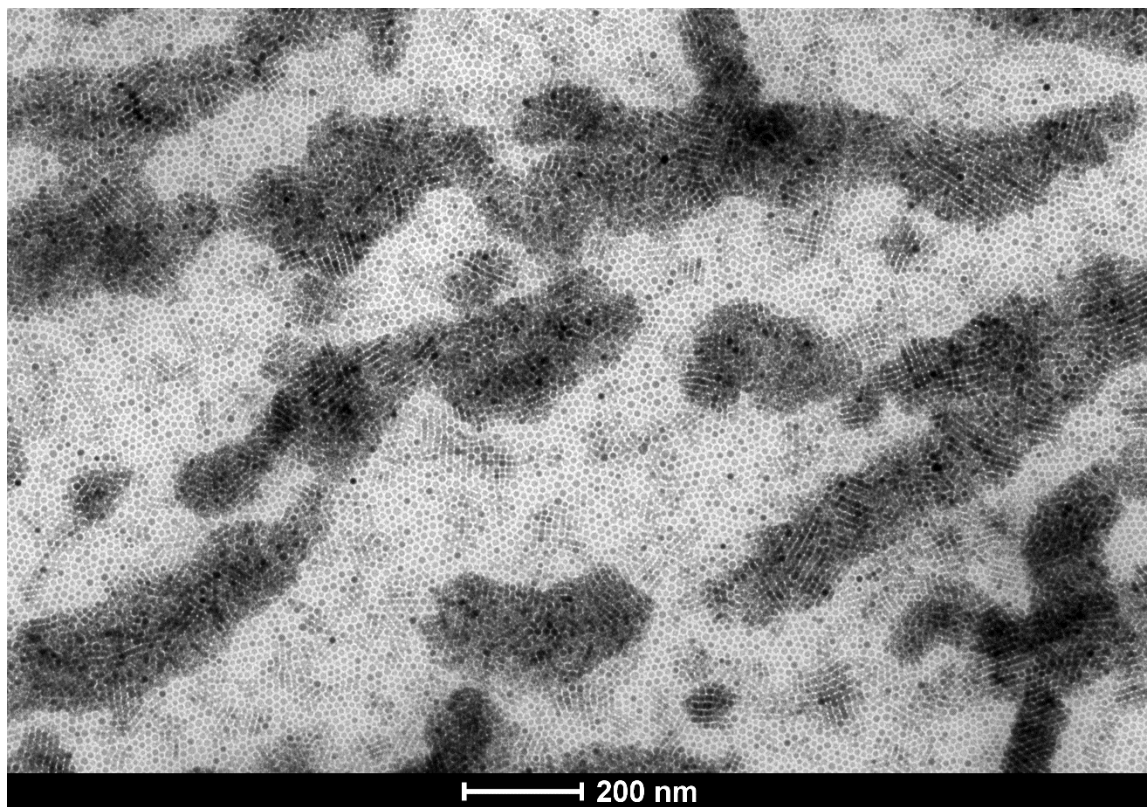
Lisa 7. Termolüüsi meetodil sünteesiks kasutatud sünteesireaktor. 1 – kuumutusmantel; 2 – mehaaniline segisti; 3 – temperatuuriandur; 4 – 300 ml mahuga ümarkolb; 5,6 – tagasivoolu jahutid; 7- väljalaske adapter; 8,9 – kummist septimid.



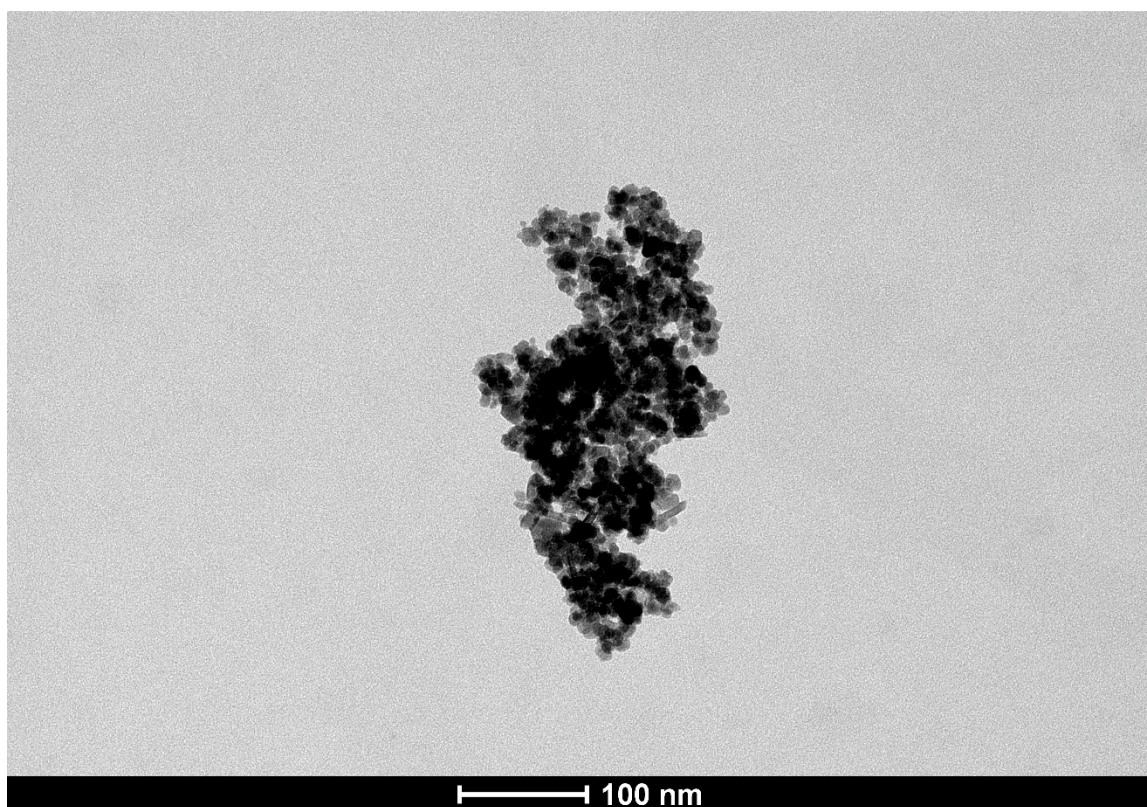
Lisa 8. Kaassadestamise meetodil sünteesiks kasutatud sünteesireaktor. 1 – magnetsegaja; 2 – 100 ml mahuga ümarkolb; 3 – kummist septumid; 4 – lihviga torukolmik 5 - pH-meeter; 6 – tilguti; 7 – lihviga voolikuühendus; 8 – gaasi pesupudel veega.



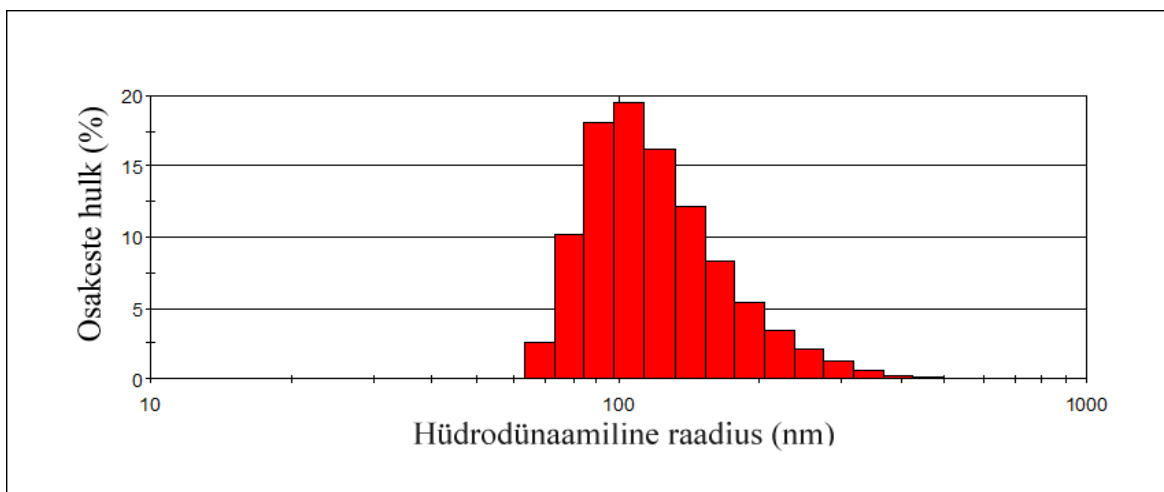
Lisa 9. Termolüüsi meetodil sünteesitud osakeste funktsionaliseerimisel kasutatud katseseade. 8 – septum; 12 – ultrahelivann; 13 – nõel; 14 – õhupall.



Lisa 10. TEM-iga loodud kujutis termolüüsi meetodil sünteesitud raudoksiidsetest nanoosakestest.



Lisa 11. TEM-iga loodud kujutis kaassadestamise meetodil sünteesitud raudoksiidsetest nanoosakestest



Lisa 12. Footonkorrelatsioonspektromeetris mõõdetud kaassadestamise meetodil sünteesitud vette dispergeeritud nanoosakeste suurusjaotus.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Holger Saare,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Superparamagnetiliste nanoosakeste sünteesimine ja iseloomustamine“, mille juhendajad on Martin Järvekülg ning Rainis Venta,

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2014**